



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/38, 15/44, 15/40, 15/35, 15/31, A61K 39/295		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/03658
			(43) Date de publication internationale: 29 janvier 1998 (29.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01313		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 15 juillet 1997 (15.07.97)		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(30) Données relatives à la priorité: 96/09338 19 juillet 1996 (19.07.96) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): MERIAL [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006 Lyon (FR). BOUCHARDON, Annabelle [FR/FR]; 118, cours Gambetta, F-69007 Lyon (FR). BAUDU, Philippe [FR/FR]; 58, avenue Edouard Simon, F-69290 Craponne (FR). RIVIERE, Michel [FR/FR]; 11, chemin du Chancelier, F-69130 Ecully (FR).			
(74) Mandataire: COLOMBET, Alain; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).			

(54) Title: POLYNUCLEOTIDE VACCINE FORMULA FOR TREATING PORCINE RESPIRATORY AND REPRODUCTIVE DISEASES

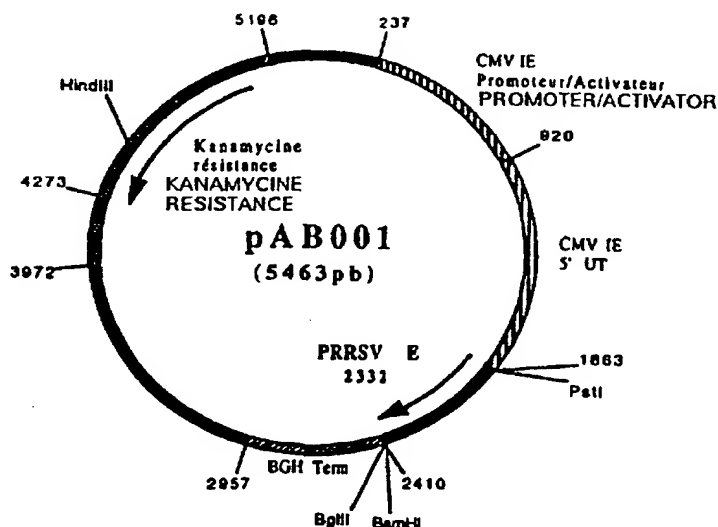
(54) Titre: FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES ET DE REPRODUCTION DES PORCS

(57) Abstract

A porcine vaccine formula for treating porcine respiratory and reproductive disease, including at least three polynucleotide vaccine valencies that each include a plasmid containing a porcine pathogen valency gene capable of being expressed *in vivo* in host cells. Said valencies are selected from two groups which consist of Aujeszky's disease virus, swine influenza virus, mysterious swine disease virus, parvovirus disease virus, pest disease virus, and bacteria causing actinobacillosis. Said plasmids include one or more genes per valency, and said genes are selected from the group which consists of gB and gD for Aujeszky's disease virus, HA, NP and N for swine influenza virus, E, N, ORF3 and M for mysterious swine disease virus, VP2 for parvovirus disease virus, E1 and E2 for pest disease virus, and apxI, apxII and apxIII for actinobacillosis virus.

(57) Abrégé

La formule de vaccin porcin contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprend au moins 3 valences de vaccin polynucleotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à exprimer *in vivo* dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi deux groupes consistant en virus de la maladie d'Aujeszky, virus de la grippe porcine, mystérieuse du porc, virus de la grippe porcine, virus de la maladie mystérieuse du porc, virus de la parvovirose, virus de la pestivirose et bactéries responsables de l'actinobacillose, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, E, N, ORF3, M pour le virus de la maladie mystérieuse, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la pestivirose et apxI, apxII et apxIII pour le virus de l'actinobacillose.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroon			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

FORMULE DE VACCIN POLYNUCLEOTIDIQUE CONTRE LES PATHOLOGIES
RESPIRATOIRES ET DE REPRODUCTION DES PORCS

La présente invention est relative à une formule de vaccin
5 permettant notamment la vaccination des porcs contre les
pathologies respiratoires et de reproduction. Elle est
également relative à une méthode de vaccination correspondante.

Au cours des dernières décennies, les méthodes de
production porcines ont fondamentalement changé. L'élevage
10 intensif en espace clos s'est généralisé avec comme corollaire
le développement dramatique des pathologies respiratoires.

L'ensemble des symptômes de pathologie respiratoire
porcine est en général regroupé sous l'appellation complexe de
maladie respiratoire des porcs et implique une grande variété
15 d'agents pathogènes, comprenant aussi bien des virus que des
bactéries et des mycoplasmes.

Les principaux agents intervenant dans les troubles
respiratoires sont Actinobacillus pleuropneumoniae, le virus de
l'infertilité et du syndrome respiratoire (PRRS) encore appelé
20 virus de la maladie mystérieuse, le virus de la maladie
d'Aujeszky (PRV) et le virus de la grippe porcine.

D'autres virus entraînent des troubles de la reproduction
se traduisant par des avortements, des momifications de fœtus
et de l'infertilité. Les principaux virus sont PRRS, le
25 parvovirus et le virus de la peste porcine classique (HCV).
Secondairement, les virus PRV grippe porcine et A.
pleuropneumoniae peuvent aussi entraîner de tels troubles. Des
mortalités peuvent intervenir avec A. pleuropneumoniae, HCV et
PRV.

30 En outre, les interactions entre les microorganismes sont
très importants dans le complexe respiratoire porcin. En effet,
la plupart des pathogènes bactériens sont des hôtes habituels
des zones nasopharyngées et des amygdales chez le jeune animal.
Ces pathogènes, qui proviennent de la truie, sont souvent
35 inhalés par les jeunes porcs durant leurs premières heures de
vie, avant que l'immunité colostrale soit devenue efficace. Les
organismes résidant dans le tractus respiratoire supérieur
peuvent envahir le tractus inférieur lorsque les mécanismes de

défense respiratoires de l'hôte sont mis à mal par un agent précurseur tel que *Actinobacillus pleuropneumoniae* ou par des virus. L'invasion pulmonaire peut être très rapide en particulier dans le cas de pathogènes précurseurs tels que *Actinobacillus pleuropneumoniae* qui produisent des cytotoxines puissantes capables d'endommager les cils des cellules épithéliales respiratoires et les macrophages alvéolaires.

Des infections virales importantes, telles que influenza, infections à coronavirus respiratoires et virus d'Aujeszky, peuvent jouer un rôle dans la pathogénie du complexe respiratoire, au côté de bactéries à tropisme respiratoire et de mycoplasmes.

Enfin certains agents ont une incidence à la fois en respiratoire et en reproduction. Des interactions peuvent aussi se produire sur le plan de la pathologie de la reproduction.

Il paraît donc nécessaire de tenter de mettre au point une prévention efficace contre les principaux agents pathogènes intervenant dans les pathologies respiratoires et de reproduction des porcs.

Les associations développées jusqu'à présent étaient réalisées à partir de vaccins inactivés ou de vaccins vivants et éventuellement de mélanges de tels vaccins. Leur mise en oeuvre pose des problèmes de compatibilité entre valences et de stabilité. Il faut en effet assurer à la fois la compatibilité entre les différentes valences de vaccin, que ce soit au plan des différents antigènes utilisés au plan des formulations elles-mêmes, notamment dans le cas où l'on combine à la fois des vaccins inactivés et des vaccins vivants. Il se pose également le problème de la conservation de tels vaccins combiné et aussi de leur innocuité notamment en présence d'adjuvant. Ces vaccins sont en général assez coûteux.

Les demandes de brevet WO-A-90 11092, WO-A-93 19183, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660 ont fait usage de la technique récemment développée des vaccins polynucléotidiques. On sait que ces vaccins utilisent un plasmide apte à exprimer dans les cellules de l'hôte l'antigène inséré dans le plasmide. Toutes les voies d'administration ont été proposées (intrapéritonéal, intraveineuse, intramusculaire, transcutanée; intradermique,

mucosale, etc.). Différents moyens de vaccination peuvent également être utilisés, tels que ADN déposé à la surface de particules d'or et projeté de façon à pénétrer dans la peau de l'animal (Tang et al., Nature 356, 152-154, 1992) et les injecteurs par jet liquide permettant de transférer à la fois dans la peau, le muscle, les tissus graisseux et les tissus mammaires (Furth et al., Analytical Biochemistry, 205, 365-368, 1992).

Les vaccins polynucléotidiques peuvent utiliser aussi bien des ADN nus que des ADN formulés par exemple au sein de liposomes de lipides cationiques.

M-F Le Potier et al., (Second International Symposium on the Eradication of Aujeszky's Disease (pseudo rabies) Virus August 6th to 8th 1995 Copenhagen, Denmark) et M. Monteil et al. (Les Journées d'Animation Scientifique du Département de Pathologie Animale, INRA-ENV, Ecole Nationale Vétérinaire de LYON, 13-14 déc 1994) ont tenté de vacciner les porcs contre le virus de la maladie d'Aujeszky à l'aide d'un plasmide permettant l'expression du gène gD sous le contrôle d'un promoteur fort, le promoteur majeur tardif de l'adénovirus de type 2. Malgré une réponse en anticorps de bon niveau, aucune protection n'a pu être mise en évidence. Or, des résultats satisfaisants en matière de protection ont été enregistrés après inoculation aux porcs d'un adénovirus recombinant dans lequel a été inséré le gène gD et le même promoteur, prouvant que la glycoprotéine gD serait suffisante pour induire une protection chez le porc.

L'art antérieur ne donne aucun résultat de protection chez le porc par la méthode de la vaccination polynucléotidique.

L'invention se propose de fournir une formule de vaccin multivalent permettant d'assurer une vaccination des porcs contre un certain nombre d'agents pathogènes intervenant notamment dans la pathologie respiratoire et/ou dans la pathologie de la reproduction.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin associant différentes valences tout en présentant tous les critères requis de compatibilité et de stabilité des valences entre elles.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin permettant d'associer différentes valences dans un même véhicule.

Un autre objectif de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin qui soit de mise en oeuvre aisée et peu coûteuse.

Un autre objectif encore de l'invention est de fournir une telle formule de vaccin et une méthode de vaccination des porcs qui permette d'obtenir une protection, y compris une protection multivalente, avec un niveau élevé d'efficacité et de longue durée, ainsi qu'une bonne innocuité et une absence de résidus.

La présente invention a donc pour objet une formule de vaccin notamment contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à l'exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi celles du groupe consistant en virus de la maladie d'Aujeszky (virus PRV ou pseudorage), virus de la grippe porcine (virus influenza porcin, SIV), virus de la maladie mystérieuse du porc (virus PRRS), virus de la parvovirose (virus PPV), virus de la peste porcine classique (virus HCV ou Hog Cholera virus) et bactérie responsable de l'actinobacillose (*A. pleuropneumoniae*), les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, ORF5 (E), ORF3, ORF6 (M) pour le virus PRRS, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la peste porcine classique et apxI, apxII et apxIII pour *A. pleuropneumoniae*.

Par valence, dans la présente invention, on entend au moins un antigène assurant une protection contre le virus du pathogène considéré, la valence pouvant contenir, à titre de sous-valence, un ou plusieurs gènes naturels modifiés d'une ou plusieurs souches du pathogène considéré.

Par gène d'agent pathogène, on entend non seulement le gène complet, mais aussi les séquences nucléotidiques

différentes, y compris fragments, conservant la capacité à induire une réponse protectrice. La notion de gène recouvre les séquences nucléotidiques équivalentes à celles décrites précisément dans les exemples, c'est-à-dire les séquences différentes mais codant pour la même protéine. Elle recouvre aussi les séquences nucléotidiques d'autres souches du pathogène considéré, assurant une protection croisée ou une protection spécifique de souche ou de groupe de souche. Elle recouvre encore les séquences nucléotidiques qui ont été modifiées pour faciliter l'expression in vivo par l'animal hôte mais codant pour la même protéine.

De manière préférée, la formule de vaccin selon l'invention comprendra les valences Aujeszky et grippe porcine auxquelles on pourra adjoindre d'autres valences, de préférence choisies parmi les valences PRRS et A. pleuropneumoniae (actinobacillose). On pourra leur adjoindre éventuellement d'autres valences choisies parmi les valences parvovirose et peste porcine classique.

Il va de soi que toutes les combinaisons de valences sont possibles. Toutefois, dans le cadre de l'invention, on considère les valences Aujeszky et grippe porcine, puis PRRS et A. pleuropneumoniae comme préférées.

Dans l'optique d'une vaccination dirigée plus spécifiquement contre la pathologie respiratoire des porcs, on préférera sélectionner les valences parmi Aujeszky, grippe porcine, PRRS et actinobacillose.

Dans l'optique d'une vaccination dirigée spécifiquement contre la pathologie de la reproduction, on préférera choisir les valences parmi PRRS, parvovirose, peste porcine classique et Aujeszky.

En ce qui concerne, la valence Aujeszky, on peut mettre en oeuvre l'un ou l'autre des gènes gB et gD. Préférentiellement, on utilise les deux gènes, ceux-ci étant dans ce cas montés dans des plasmides différents ou dans un seul et même plasmide.

En ce qui concerne la valence grippe porcine, on préfère mettre en oeuvre les gènes HA et NP. On peut utiliser l'un ou l'autre de ces deux gènes ou les deux gènes simultanément, montés dans des plasmides différents ou dans un seul et même

plasmide. De préférence, on associera dans le même vaccin les séquences HA de plus d'une souche de virus influenza, en particulier des différentes souches rencontrées sur le terrain. En revanche, NP assure une protection croisée et l'on pourra donc se contenter de la séquence d'une seule souche du virus.

En ce qui concerne la valence PRRS, on préfère utiliser les gènes E et ORF3 ou encore M. On peut utiliser ces gènes seuls ou en combinaison ; dans le cas d'une combinaison, on peut monter les gènes dans des plasmides séparés ou dans des plasmides combinant 2 ou 3 de ces gènes. On pourra avantageusement associer dans le même vaccin des gènes provenant d'au moins deux souches, notamment d'une souche européenne et d'une souche américaine.

En ce qui concerne la valence peste porcine classique, on peut utiliser l'un ou l'autre des gènes E1 et E2 ou également des gènes E1 et E2 combinés, dans deux plasmides différents ou éventuellement dans un seul et même plasmide.

En ce qui concerne la valence actinobacillose, on peut utiliser l'un des trois gènes cités plus haut ou une combinaison de 2 ou 3 de ces gènes, montés dans des plasmides différents ou des plasmides mixtes, afin d'assurer une protection contre les différents sérotypes de *A. pleuropneumoniae*. Pour les antigènes apxI, II et III, on peut prévoir de modifier les séquences codantes pour obtenir les antigènes détoxifiés, en particulier comme dans les exemples.

La formule de vaccin selon l'invention pourra se présenter sous un volume de dose compris de manière générale entre 0,1 et 10 ml, et en particulier entre 1 et 5 ml notamment pour les vaccinations par voie intramusculaire.

La dose sera généralement comprise entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg et préférentiellement entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

On utilisera de préférence des plasmides nus simplement placés dans le véhicule de vaccination qui sera en général de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), de l'eau ultrapure, du tampon TE, etc. On peut bien entendu utiliser toutes les formes de vaccin polynucléotidiques décrites dans l'art antérieur.

Chaque plasmide comprend un promoteur apte à assurer

l'expression du gène inséré sous sa dépendance dans les cellules hôtes. Il s'agira en général d'un promoteur eucaryote fort et en particulier d'un promoteur précoce du cytomégalo virus CMV-IE, d'origine humaine ou murine, ou encore éventuellement d'une autre origine telle que rat, cochon, cobaye.

De manière plus générale, le promoteur pourra être soit d'origine virale, soit d'origine cellulaire. Comme promoteur viral, on peut citer le promoteur précoce ou tardif du virus SV40 ou le promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous. Il peut aussi s'agir d'un promoteur du virus dont provient le gène, par exemple le promoteur propre au gène.

Comme promoteur cellulaire, on peut citer le promoteur d'un gène du cytosquelette, par exemple le promoteur de la desmine (Bolmont et al., Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology, 1990, 22, 117-122 ; et ZHENLIN et al., Gene, 1989, 78, 243-254), ou encore le promoteur de l'actine.

Lorsque plusieurs gènes sont présents dans le même plasmide, ceux-ci peuvent être présentés dans la même unité de transcription ou dans deux unités différentes.

La combinaison des différentes valences du vaccin selon l'invention peut être effectuée, de préférence, par le mélange de plasmides polynucléotidiques exprimant le ou les antigène(s) de chaque valence, mais on peut également prévoir de faire exprimer des antigènes de plusieurs valences par un même plasmide.

L'invention a encore pour objet des formules de vaccin monovalent comprenant un ou plusieurs plasmides codant pour un ou plusieurs gènes de l'un des virus choisis parmi le groupe consistant en PRV, PRRS, PPV, HCV et A. pleuropneumoniae, les gènes étant ceux décrits plus haut. En dehors de leur caractère monovalent, ces formules peuvent reprendre les caractéristiques énoncées plus haut en ce qui concerne le choix des gènes, leurs combinaisons, la composition des plasmides, les volumes de dose, les doses, etc.

Les formules de vaccin monovalent peuvent être utilisées (i) pour la préparation d'une formule de vaccin polyvalent tel que décrit plus haut, (ii) à titre individuel contre la

pathologie propre, (iii) associées à un vaccin d'un autre type (entier vivant ou inactivé, recombinant, sous-unité) contre une autre pathologie, ou (iv) comme rappel d'un vaccin comme décrit ci-après.

5 La présente invention a en effet encore pour objet l'utilisation d'un ou de plusieurs plasmides selon l'invention pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les porcs primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin classique du type de ceux de la technique antérieure, à savoir notamment choisi
10 dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin (monovalent ou multivalent) présentant (c'est-à-dire contenant ou pouvant exprimer) le ou les antigène(s) codé(s) par le ou les plasmides ou antigène(s) assurant une
15 protection croisée. De manière remarquable, le vaccin polynucléotidique a un effet de rappel puissant se traduisant par une amplification de la réponse immunitaire et l'installation d'une immunité de longue durée.

De manière générale, les vaccins de primo-vaccination
20 pourront être choisis parmi les vaccins commerciaux disponibles auprès des différents producteurs de vaccins vétérinaires.

L'invention a aussi pour objet un kit de vaccination regroupant un vaccin de primo-vaccination tel que décrit ci-dessus et une formule de vaccin selon l'invention pour le
25 rappel. Elle a aussi trait à une formule de vaccin selon l'invention accompagnée d'une notice indiquant l'usage de cette formule comme rappel d'une primo-vaccination telle que décrite ci-avant.

La présente invention a également pour objet une méthode
30 de vaccination des porcs contre la pathologie respiratoire et/ou la pathologie de la reproduction des porcs, comprenant l'administration d'une dose efficace d'une formule de vaccin telle que décrit plus haut. Cette méthode de vaccination comprend l'administration d'une ou de plusieurs doses de la
35 formule de vaccin, ces doses pouvant être administrées successivement dans un court laps de temps et/ou successivement à des moments éloignés l'un de l'autre.

Les formules de vaccin selon l'invention pourront être

administrées dans le cadre de cette méthode de vaccination, par les différentes voies d'administration proposées dans l'art antérieur pour la vaccination polynucléotidique et au moyen des techniques d'administration connues. On pourra notamment
5 utiliser la vaccination par voie intradermique à l'aide d'un injecteur par jet liquide, de préférence par jets multiples, et en particulier un injecteur utilisant une tête d'injection munie de plusieurs trous ou buses, notamment comprenant de 5 à 6 trous ou buses, tel que l'appareil Pigjet fabriqué et
10 distribué par la société Endoscoptic, Laons, France.

Le volume de dose pour un tel appareil sera réduit de préférence entre 0,1 et 0,9 ml, en particulier entre 0,2 et 0,6 ml et avantageusement entre 0,4 et 0,5 ml, le volume pouvant être appliqué en une ou plusieurs, de préférence 2,
15 applications.

L'invention a encore pour objet la méthode de vaccination consistant à faire une primo-vaccination telle que décrite ci-dessus et un rappel avec une formule de vaccin selon l'invention. Dans une forme de mise en oeuvre préférée du
20 procédé selon l'invention, on administre dans un premier temps, à l'animal, une dose efficace du vaccin de type classique, notamment inactivé, vivant, atténué ou recombinant, ou encore un vaccin de sous-unité de façon à assurer une primo-vaccination, et, après un délai de préférence de 2 à 6
25 semaines, on assure l'administration du vaccin polyvalent ou monovalent selon l'invention.

L'invention concerne aussi la méthode de préparation des formules de vaccin, à savoir la préparation des valences et leurs mélanges, telle qu'elle ressort de cette description.

30 L'invention va être maintenant décrite plus en détails à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris en référence aux dessins annexés.

Liste des figures

- Figure N° 1 : Plasmide pVR1012
- Figure N° 2 : Séquence du gène PRV gB (souche NIA3)
- 5 Figure N° 3 : Construction du plasmide pAB090
- Figure N° 4 : Séquence du gène PRV gD (souche NIA3)
- Figure N° 5 : Construction du plasmide pPB098
- Figure N° 6 : Séquence du gène Grippe porcine HA (souche H1N1)
- Figure N° 7 : Construction du plasmide pPB143
- 10 Figure N° 8 : Séquence du gène Grippe porcine NP (souche H1N1)
- Figure N° 9 : Construction du plasmide pPB142
- Figure N° 10 : Séquence du gène Grippe porcine HA (souche H3N2)
- Figure N° 11 : Construction du plasmide pPB144
- Figure N° 12 : Séquence du gène Grippe porcine NP (souche H3N2)
- 15 Figure N° 13 : Construction du plasmide pPB132
- Figure N° 14 : Plasmide pAB025
- Figure N° 15 : Plasmide pAB001
- Figure N° 16 : Plasmide pAB091
- Figure N° 17 : Plasmide pAB092
- 20 Figure N° 18 : Plasmide pAB004
- Figure N° 19 : Plasmide pAB069
- Figure N° 20 : Plasmide pAB061
- Figure N° 21 : Plasmide pPB162
- Figure N° 22 : Plasmide pPB163
- 25 Figure N° 23 : Plasmide pPB174'
- Figure N° 24 : Plasmide pPB189
- Figure N° 25 : Plasmide pPB190

Liste des séquences SEQ ID N°

- SEQ ID N° 1 : Séquence du gène PRV gB (souche NIA3)
- SEQ ID N° 2 : Oligonucléotide AB166
- 5 SEQ ID N° 3 : Oligonucléotide AB167
- SEQ ID N° 4 : Oligonucléotide AB168
- SEQ ID N° 5 : Oligonucléotide AB169
- SEQ ID N° 6 : Séquence du gène PRV gD (souche NIA3)
- SEQ ID N° 7 : Oligonucléotide PB101
- 10 SEQ ID N° 8 : Oligonucléotide PB102
- SEQ ID N° 9 : Oligonucléotide PB107
- SEQ ID N° 10 : Oligonucléotide PB108
- SEQ ID N° 11 : Séquence du gène grippe porcine HA (souche H1N1)
- SEQ ID N° 12 : Oligonucléotide PB097
- 15 SEQ ID N° 13 : Oligonucléotide PB098
- SEQ ID N° 14 : Séquence du gène grippe porcine NP (souche H1N1)
- SEQ ID N° 15 : Oligonucléotide PB095
- SEQ ID N° 16 : Oligonucléotide PB096
- SEQ ID N° 17 : Séquence du gène grippe porcine HA (souche H3N2)
- 20 SEQ ID N° 18 : Séquence du gène grippe porcine NP (souche H3N2)
- SEQ ID N° 19 : Oligonucléotide AB055
- SEQ ID N° 20 : Oligonucléotide AB056
- SEQ ID N° 21 : Oligonucléotide AB001
- SEQ ID N° 22 : Oligonucléotide AB002
- 25 SEQ ID N° 23 : Oligonucléotide AB170
- SEQ ID N° 24 : Oligonucléotide AB171
- SEQ ID N° 25 : Oligonucléotide AB172
- SEQ ID N° 26 : Oligonucléotide AB173
- SEQ ID N° 27 : Oligonucléotide AB007
- 30 SEQ ID N° 28 : Oligonucléotide AB010
- SEQ ID N° 29 : Oligonucléotide AB126
- SEQ ID N° 30 : Oligonucléotide AB127

	SEQ ID N° 31 :	Oligonucléotide AB118
	SEQ ID N° 32 :	Oligonucléotide AB119
	SEQ ID N° 33 :	Oligonucléotide PB174
	SEQ ID N° 34 :	Oligonucléotide PB189
5	SEQ ID N° 35 :	Oligonucléotide PB190
	SEQ ID N° 36 :	Oligonucléotide PB175
	SEQ ID N° 37 :	Oligonucléotide PB176
	SEQ ID N° 38 :	Oligonucléotide PB191
	SEQ ID N° 39 :	Oligonucléotide PB192
10	SEQ ID N° 40 :	Oligonucléotide PB177
	SEQ ID N° 41 :	Oligonucléotide PB278
	SEQ ID N° 42 :	Oligonucléotide PB279
	SEQ ID N° 43 :	Oligonucléotide PB280
	SEQ ID N° 44 :	Oligonucléotide PB307
15	SEQ ID N° 45 :	Oligonucléotide PB303
	SEQ ID N° 46 :	Oligonucléotide PB306
	SEQ ID N° 47 :	Oligonucléotide PB304
	SEQ ID N° 48 :	Oligonucléotide PB305

EXEMPLES

Exemple 1 : Culture des virus

Les virus sont cultivés sur le système cellulaire approprié jusqu'à obtention d'un effet cytopathique. Les systèmes cellulaires à utiliser pour chaque virus sont bien connus de l'homme du métier. Brièvement, des cellules sensibles au virus utilisé, cultivées en milieu minimum essentiel de Eagle (milieu "MEM") ou un autre milieu approprié, sont inoculées avec la souche virale étudiée en utilisant une multiplicité d'infection de 1. Les cellules infectées sont alors incubées à 37°C pendant le temps nécessaire à l'apparition d'un effet cytopathique complet (en moyenne 36 heures).

Exemple 2 : Culture des bactéries et extraction de l'ADN bactérien

Les souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ont été cultivées comme décrit par A. Rycroft *et al.* (J. Gen. Microbiol. 1991. 137. 561-568). L'ADN de haut poids moléculaire (ADN chromosomique) a été préparé selon les techniques standards décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989).

Exemple 3 : Extraction des ADNs génomiques viraux:

Après culture, le surnageant et les cellules lysées sont récoltées et la totalité de la suspension virale est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes à + 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les particules virales sont alors récoltées par ultracentrifugation à 400000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le culot est repris dans un volume minimum de tampon (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0). Cette suspension virale concentrée est traitée par la protéinase K (100 µg/ml final) en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS) (0,5% final) pendant 2 heures à 37°C. L'ADN viral est ensuite extrait avec un mélange de phénol/chloroforme, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit à - 20°C, l'ADN est centrifugé à 10000 g pendant 15 minutes à + 4°C. Le culot d'ADN est séché, puis repris dans un volume minimum d'eau ultrapure stérile. Il peut alors être digéré par des enzymes de restriction.

Exemple 4 : Isolement des ARNs génomiques viraux

Les virus à ARN ont été purifiés selon les techniques bien connues de l'homme du métier. L'ARN viral génomique de chaque virus a été ensuite isolé en
5 utilisant la technique d'extraction "thiocyanate de guanidium/phénol-chloroforme" décrite par P. Chomczynski et N. Sacchi (Anal. Biochem. 1987, 162, 156-159).

Exemple 5 : Techniques de biologie moléculaire

10 Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit
15 "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Exemple 6 : Technique de RT-PCR

Des oligonucléotides spécifiques (comportant à leurs extrémités 5' des sites de restriction pour faciliter le clonage des fragments amplifiés) ont été synthétisés
20 de telle façon qu'ils couvrent entièrement les régions codantes des gènes devant être amplifiés (voir exemples spécifiques). La réaction de transcription inverse (RT) et l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les techniques standards (J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold
25 Spring Harbor, New York, 1989). Chaque réaction de RT-PCR a été faite avec un couple d'amplimers spécifiques et en prenant comme matrice l'ARN génomique viral extrait. L'ADN complémentaire amplifié a été extrait au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) avant d'être digéré par les enzymes de restriction.

30

Exemple 7 : plasmide pVR1012

Le plasmide pVR1012 (Figure N° 1) a été obtenu auprès de Vical Inc. San

Diego, CA, USA. Sa construction a été décrite dans J. Hartikka *et al.* (Human Gene Therapy. 1996. 7. 1205-1217).

Exemple 8 : Construction du plasmide pAB090 (gène PRV gB)

- 5 Le plasmide pPR2.15 (M. Rivière *et al.* J. Virol. 1992. 66. 3424-3434) a été digéré avec *Apal* et *NaeI* pour libérer un fragment *Apal*-*NaeI* de 2665 pb (fragment A) contenant le gène codant pour la glycoprotéine gB du virus de la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (Figure N° 2 et SEQ ID N° 1).

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

- 10 AB166 (33 mer) (SEQ ID N° 2)

5'GATGCCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCGGGCC 3'

AB167 (33 mer) (SEQ ID N° 3)

5'ACGTCTACGGGCGACCAACCGCCAGAAACCGCGC 3'

un fragment de 33 pb contenant la séquence du gène gD, du codon initial ATG

- 15 jusqu'au site *Apal* a été reconstitué, avec création d'un site *PstI* en 5' (fragment B).

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

AB168 (45 mer) (SEQ ID N° 4)

5'GGCACTACCAGCGCCTCGAGAGCGAGGACCCCGACGCCCTGTAGG 3'

- 20 AB169 (49 mer) (SEQ ID N° 5)

5'GATCCCTACAGGGCGTCGGGGTCCTCGCTCTCGAGGCGCTGGTAGTGCC 3'

un fragment de 45 pb contenant la séquence du gène gD, du site *NaeI* au codon stop TAG a été reconstitué, avec création d'un site *BamHI* en 3' (fragment C).

- 25 Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB090 (7603 pb) (Figure N° 3).

Exemple 9 : Construction du plasmide pPB098 (gène PRV gD)

- 30 Le plasmide pPR29 (M. Rivière *et al.* J. Virol. 1992. 66. 3424-3434) a été digéré par *SaI* et *BglII* pour libérer un fragment *SaI*-*BglII* de 711 pb (fragment A) contenant la partie 3' du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus de

la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (Figure N° 4 et SEQ ID N° 6).

Le plasmide pPR29 a été digéré par *Eco47III* et *Sa/I* pour libérer un fragment *Eco47III-Sa/I* de 498 pb contenant la partie 5' du gène codant pour la glycoprotéine gD du virus de la maladie d'Aujeszky (Souche NIA3) (fragment

5 B).

Par hybridation des 2 oligonucléotides suivants:

PB101 (15 mer) (SEQ ID N° 7)

5'GATGCTGCTCGCAGC 3'

PB102 (19 mer) (SEQ ID N° 8)

10 5'GCTGCGAGCAGCATCTGCA 3'

un fragment de 15 pb contenant la séquence 5' du gène gD, du codon initial ATG jusqu'au site *Eco47III* a été reconstitué, avec création d'un site *PstI* en 5' (fragment C).

Après purification, les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble dans le

15 vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *PstI* et *BglII*, pour donner le plasmide pPB098 (6076 pb) (Figure N° 5).

Exemple 10 : Construction du plasmide pPB143 (gène Grippe porcine HA souche H1N1)

20 Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H1N1 "SW"), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

PB107 (32 mer) (SEQ ID N° 9)

25 5'GTTCTGCAGCACCCGGGAGCAAAAGCAGGGGA 3'

PB108 (33 mer) (SEQ ID N° 10)

5'ATTGCGGCCGCTAGTAGAAACAAGGGTGT TTTT 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine HA du SIV H1N1 (Figure N° 6 et SEQ ID N° 11) sous la forme d'un fragment PCR de 1803 pb.

30 Après purification, ce fragment a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01), pour donner le vecteur pPB137 (5755 pb).

Le vecteur pPB137 a été digéré par *EcoRV* et *NorI* pour libérer un fragment

EcoRV-NotI de 1820 pb contenant le gène HA. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *EcoRV* et *NotI*, pour donner le plasmide pPB143 (6726 pb) (Figure N° 7).

5 Exemple 11 : Construction du plasmide pPB142 (gène Grippe porcine NP souche H1N1)

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H1N1 "SW"), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les

10 oligonucléotides suivants:

PB097 (36 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CCGGTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTA'TTTTCT 3'

15 en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine NP du SIV H1N1 (Figure N° 8 et SEQ ID N° 14) sous la forme d'un fragment Sall-NotI. Après purification le produit de RT-PCR de 1566 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01), pour donner le vecteur pPB127 (5519 pb).

20 Le vecteur pPB127 a été digéré par *SaI* et *NotI* pour libérer un fragment Sall-NotI de 1560 pb contenant le gène NP. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par *SaI* et *NotI*, pour donner le plasmide pPB142 (6451 pb) (Figure N° 9).

25 Exemple 12 : Construction du plasmide pPB144 (gène Grippe porcine HA souche H3N2)

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H3N2 Côtes-du Nord 1987), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et

30 avec les oligonucléotides suivants:

PB095 (31 mer) (SEQ ID N° 15)

5'GTTCTGCAGGCAGGGGATAATTCTATCAACC 3'

PB096 (36 mer) (SEQ ID N° 16)

5'TTGCGGCCGCAAGGGTGT TTTTAATTACTAATATAC 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine HA du SIV H3N2 (Figure N° 10 et SEQ ID N° 17) sous la forme d'un fragment PstI-NotI. Après

5 purification, le produit de RT-PCR de 1765 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01) pour donner le vecteur pPB120 (5716 pb).

Le vecteur pPB120 a été digéré par NotI pour libérer un fragment NotI-NotI de 1797 pb contenant le gène HA. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le
10 vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par NotI, pour donner le plasmide pPB144 (6712 pb) contenant le gène HA H3N2 dans l'orientation correcte par rapport au promoteur (Figure N° 11).

**Exemple 13 : Construction du plasmide pPB132 (gène Grippe porcine NP
15 souche H3N2)**

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la grippe porcine (souche SIV H3N2 Côtes du Nord 1987), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

20 PB097 (36 mer) (SEQ ID N° 12)

5'CCGGTTCGACCGGGATAATCACTCACTGAGTGACATC 3'

PB098 (33 mer) (SEQ ID N° 13)

5'TTGCGGCCGCTGTAGAAACAAGGGTATTTTCT 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la protéine NP du SIV H3N2
25 (Figure N° 12 et SEQ ID N° 18) sous la forme d'un fragment SalI-NotI. Après purification le produit de RT-PCR de 1564 pb a été ligaturé avec le vecteur PCRII-direct (Invitrogen Référence K2000-01) pour donner le vecteur pPB123 (5485 pb).

Le vecteur pPB123 a été digéré par SalI et NotI pour libérer un fragment SalI-
30 NotI de 1558 pb contenant le gène NP. Ce fragment a ensuite été ligaturé dans le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré par SalI et NotI, pour donner le plasmide pPB132 (6449 pb) (Figure N° 13).

Exemple 14 : Construction du plasmide pAB025 (gène PRRSV ORF5) souche Lelystad.

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche Lelystad) (J.

- 5 Meulenbergh *et al.* Virology. 1993. 19. 62-72), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB055 (34 mer) (SEQ ID N° 19)

5'ACGCGTCGACAATATGAGATGTTCTCACAAATTG 3'

AB056 (33 mer) (SEQ ID N° 20)

- 10 5'CGCGGATCCCGTCTAGGCCTCCCATTGCTCAGC 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF5" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E (gp25) du virus PRRS souche Lelystad. Après purification, le produit de RT-PCR de 630 pb a été digéré par *SalI* et *BamHI* pour isoler un fragment *SalI*-*BamHI* de 617 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur

- 15 pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *SalI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB025 (5486 pb) (Figure N° 14).

Exemple 15 : Construction du plasmide pAB001 PRRSV ORF5 souche USA

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été

- 20 réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche ATCC-VR2332) (M. Murtaugh *et al.* Arch Virol. 1995. 140. 1451-1460), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB001 (30 mer) (SEQ ID N° 21)

5'AACTGCAGATGTTGGAGAAATGCTTGACCG 3'

- 25 AB002 (30 mer) (SEQ ID N° 22)

5'CGGGATCCCTAAGGACGACCCCATTGTTCC 3'

en vue d'isoler précisément le gène codant pour la glycoprotéine d'enveloppe E ("gp25") du virus PRRS souche ATCC-VR2332. Après purification, le produit de RT-PCR de 620 pb a été digéré par *PstI* et *BamHI* pour isoler un fragment

- 30 *PstI*-*BamHI* de 606 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *PstI* et *BamHI*, pour donner le plasmide pAB001 (5463 pb) (Figure N° 15).

Exemple 16 : Construction du plasmide pAB091 (gène PPRSV ORF3) souche Lelystad.

Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche Lelystad) (J. Meulenberg *et al.* Virology. 1993. 19. 62-72), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB170 (32 mer) (SEQ ID N° 23)

5'AAACTGCAGCAATGGCTCATCAGTGTGCACGC 3'

AB171 (30 mer) (SEQ ID N° 24)

10 5'CGCGGATCCTTATCGTGATGTACTGGGGAG 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF3" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe "gp45" du virus PRRS souche Lelystad. Après purification, le produit de RT-PCR de 818 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 802 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur

15 pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB091 (5660 pb) (Figure N° 16).

Exemple 17 : Construction du plasmide pAB092 (gène PPRSV ORF3 souche USA.

20 Une réaction de RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus PRRSV (Souche ATCC-VR2332) (M. Murtaugh *et al.* Arch Virol. 1995. 140. 1451-1460), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB172 (32 mer) (SEQ ID N° 25)

25 5'AAACTGCAGCAATGGTTAATAGCTGTACATTC 3'

AB173 (32 mer) (SEQ ID N° 26)

5'CGCGGATCCCTATCGCCGTACGGCACTGAGGG 3'

en vue d'isoler précisément le gène "ORF3" codant pour la glycoprotéine d'enveloppe "gp45" du virus PRRS souche ATCC-VR2332. Après purification,

30 le produit de RT-PCR de 785 pb a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour isoler un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 769 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner

le plasmide pAB092 (5627 pb) (Figure N° 17).

Exemple 18 : Construction du plasmide pAB004 (gène Parvovirus porcin VP2).

Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée
5 avec l'ARN génomique du parvovirus porcin (Souche NADL2) (J. Vasudevacharya *et al.* Virology. 1990. 178. 611-616), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB007 (33 mer) (SEQ ID N° 27)

5'AAAACTGCAGAATGAGTGAAAATGTGGAACAAC 3'

10 AB010 (33 mer) (SEQ ID N° 28)

5'CGCGGATCCCTAGTATAATTTTCTTGGTATAAG 3'

pour amplifier un fragment de 1757 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 du parvovirus porcin. Après purification le produit de RT-PCR a été digéré par *Pst*I et *Bam*HI pour donner un fragment *Pst*I-*Bam*HI de 1740 pb.

15 Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Pst*I et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB004 (6601 pb) (Figure N° 18).

Exemple 19 : Construction du plasmide pAB069 (gène Peste porcine HCV E1).

20 Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée avec l'ARN génomique du virus de la peste porcine (Hog Cholera Virus) (HCV) (Souche Alfort) (G. Meyers *et al.*, Virology. 1989. 171. 18-27), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB126 (36 mer) (SEQ ID N° 29)

25 5'ACGCGTCGACATGAACTAGAAAAAGCCCTGTTGGC 3'

AB127 (34 mer) (SEQ ID N° 30)

5'CGCGGATCCTCATAGCCGCCCTTGTGCCCCGGTC 3'

pour isoler la séquence codant pour la protéine E1 du virus HCV sous la forme d'un fragment RT-PCR de 1363 pb. Après purification, ce fragment a été digéré

30 par *Sa*II et *Bam*HI pour donner un fragment *Sa*II-*Bam*HI de 1349 pb.

Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sa*II et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB069 (6218 pb) (Figure

N° 19).

Exemple 20 : Construction du plasmide pAB061 (gène Peste porcine HCV E2).

Une réaction RT-PCR selon la technique décrite dans l'exemple 6 a été réalisée

- 5 avec l'ARN génomique du virus de la peste porcine (Hog Cholera Virus) (HCV) (Souche Alfort) (G. Meyers *et al.*, Virology. 1989. 171. 18-27), préparé selon la technique décrite dans l'exemple 4, et avec les oligonucléotides suivants:

AB118 (36 mer) (SEQ ID N° 31)

5'ACGCGTCGACATGTCAACTACTGCGTTTCTCATTTG 3'

- 10 AB119 (33 mer) (SEQ ID N° 32)

5'CGCGGATCCTCACTGTAGACCAGCAGCGAGCTG 3'

pour isoler la séquence codant pour la protéine E2 du virus HCV sous la forme d'un fragment RT-PCR de 1246 pb. Après purification, ce fragment a été digéré par *Sall* et *Bam*HI pour donner un fragment *Sall*-*Bam*HI de 1232 pb. Ce

- 15 fragment a été ligaturé avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec *Sall* et *Bam*HI, pour donner le plasmide pAB061 (6101 pb) (Figure N° 20).

Exemple 21 : Construction du plasmide pPB162 (gène *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxl délété).

- 20 Le gène apxl d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 719 et 846.

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 1) (J. Frey *et al.*, Infect. Immun. 1991. 59. 3026-3032), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB174 (32 mer) (SEQ ID N° 33)

5'TTGTCGACGTAAATAGCTAAGGAGACAACATG 3'

- 30 PB189 (29 mer) (SEQ ID N° 34)

5'TTGAATTCTTCTTCAACAGAATGTAATTC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxl codant pour la protéine hémolysine I d'

Actinobacillus pleuropneumoniae, sous la forme d'un fragment Sall-EcoRI. Après purification, le produit de PCR de 2193 pb a été digéré par Sall et EcoRI pour isoler un fragment Sall-EcoRI de 2183 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 1) (J. Frey *et al.*, Infect. Immun. 1991. 59. 3026-3032) et avec les oligonucléotides suivants:

PB190 (31 mer) (SEQ ID N° 35)

5'TTGAATTCTATCGCTACAGTAAGGAGTACGG 3'

PB175 (31 mer) (SEQ ID N° 36)

10 5'TTGGATCCGCTATTTATCATCTAAAAATAAC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène *apxl* codant pour la protéine hémolysine I d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment EcoRI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 576 pb a été digéré par EcoRI et BamHI pour isoler un fragment EcoRI-BamHI de 566 pb (fragment B). Les fragments

15 A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB162 (7619 pb) (Figure N° 21).

Exemple 22 : Construction du plasmide pPB163 (gène *Actinobacillus pleuropneumoniae* *apxII* délété).

Le gène *apxII* d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 716 et 813.

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 9) (M. Smits *et al.*, Infection and Immunity. 1991. 59. 4497-4504), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB176 (31 mer) (SEQ ID N° 37)

5'TTGTCGACGATCAATTATATAAAGGAGACTC 3'

30 PB191 (30 mer) (SEQ ID N° 38)

5'TTGAATTCCTCTTCAACTGATTTGAGTGAG 3'

pour amplifier la partie 5' du gène *apxII* codant pour la protéine hémolysine II

d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment Sall-EcoRI. Après purification, le produit de PCR de 2190 pb a été digéré par Sall et EcoRI pour isoler un fragment Sall-EcoRI de 2180 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 9) (M. Smits *et al.*, Infection and Immunity. 1991. 59. 4497-4504) et avec les oligonucléotides suivants:

PB192 (29 mer) (SEQ ID N° 39)

5'TTGAATTCGTAAATCTTAAAGACCTCACC 3'

PB177 (30 mer) (SEQ ID N° 40)

10 5'TTGGATCCACCATAGGATTGCTATGATTTG 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxII codant pour la protéine hémolysine II d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*, sous la forme d'un fragment EcoRI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 473 pb a été digéré par EcoRI et BamHI pour isoler un fragment EcoRI-BamHI de 463 pb (fragment B).

15 Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB163 (7513 pb) (Figure N° 22).

Exemple 23 : Construction des plasmides pPB174', pPB189 et pPB190 (gène

20 *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIII délété).

Premier exemple de délétion dans AxIII (plasmide pPB174') :

Le gène apxIII d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 733 et 860.

25

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

30 PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

5'TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB279 (29 mer) (SEQ ID N° 42)

5'TTTATCGATTCTTCTACTGAATGTAATTC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI. Après purification, le produit de PCR de 2216 pb a été digéré par Sall et ClaI
5 pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2205 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB280 (33 mer) (SEQ ID N° 43)

10 5'TTTATCGATTTATGTTTATCGTTCCACTTCAGG 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI.

15 Après purification, le produit de PCR de 596 pb a été digéré par ClaI et BamHI pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 583 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB174' (7658 pb) (Figure N° 23).

20

Deuxième exemple de délétion dans ApxIII (plasmide pPB189) :

Le gène apxIII d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 705 et 886.

25 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

30 5'TTTGTGCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

PB303 (32 mer) (SEQ ID N° 45)

5'TTTATCGATTTCTTCACGTTTACCAACAGCAG 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI. Après purification, le produit de PCR de 2133 pb a été digéré par Sall et ClaI pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2122 pb (fragment A).

- 5 Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB306 (31 mer) (SEQ ID N° 46)

5'TTTATCGATTCTGATTTTTCCTTCGATCGTC 3'

- 10 PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 518 pb a été digéré par ClaI et BamHI

- 15 pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 506 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB189 (7496 pb) (Figure N° 24).

- 20 Troisième exemple de délétion dans ApxIII (plasmide pPB190) :

Le gène apxIII d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* a été cloné de façon à déléter la région en acides aminés riche en glycine (impliquée dans la fixation de l'ion calcium) comprise entre les acides aminés 718 et 876.

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d' *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815), préparé selon la technique décrite dans les exemples 2 et 3, et avec les oligonucléotides suivants:

PB278 (30 mer) (SEQ ID N° 41)

5'TTTGTCGACATGAGTACTTGGTCAAGCATG 3'

- 30 PB304 (33 mer) (SEQ ID N° 47)

5'TTTATCGATACCTGATTGCGTTAATTCATAATC 3'

pour amplifier la partie 5' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III

d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment Sall-ClaI. Après purification, le produit de PCR de 2172 pb a été digéré par Sall et ClaI pour isoler un fragment Sall-ClaI de 2161 pb (fragment A).

Une réaction de PCR a été réalisée avec l'ADN génomique d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sérotype 8) (M. Smits. 1992. N° d'accès séquence Genbank = X68815) et avec les oligonucléotides suivants:

PB305 (31 mer) (SEQ ID N° 48)

5'TTTATCGATAAATCTAGTGATTAGATAAAC 3'

PB307 (32 mer) (SEQ ID N° 44)

10 5'TTGGATCCTTAAGCTGCTCTAGCTAGGTTACC 3'

pour amplifier la partie 3' du gène apxIII (codant pour la protéine hémolysine III d' *Actinobacillus pleuropneumoniae*) sous la forme d'un fragment ClaI-BamHI. Après purification, le produit de PCR de 548 pb a été digéré par ClaI et BamHI pour isoler un fragment ClaI-BamHI de 536 pb (fragment B).

15 Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pVR1012 (exemple 7), préalablement digéré avec Sall et BamHI, pour donner le plasmide pPB190 (7565 pb) (Figure N° 25).

Exemple 24 : Préparation et purification des plasmides

20 Pour la préparation des plasmides destinés à la vaccination des animaux, on peut utiliser toute technique permettant d'obtenir une suspension de plasmides purifiés majoritairement sous forme superenroulée. Ces techniques sont bien connues de l'homme de l'art. On peut citer en particulier la technique de lyse alcaline suivie de deux ultracentrifugations successives sur gradient de chlorure

25 de césium en présence de bromure d'éthidium telle que décrite dans J. Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989). On peut se référer également aux demandes de brevet PCT WO 95/21250 et PCT WO 96/02658 qui décrivent des méthodes pour produire à l'échelle industrielle des

30 plasmides utilisables pour la vaccination. Pour les besoins de la fabrication des vaccins (voir exemple 17), les plasmides purifiés sont resuspendus de manière à obtenir des solutions à haute concentration (> 2 mg/ml)-compatibles avec

le stockage. Pour ce faire, les plasmides sont resuspendus soit en eau ultrapure, soit en tampon TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Exemple 25 : Fabrication des vaccins associés

- 5 Les divers plasmides nécessaires à la fabrication d'un vaccin associé sont mélangés à partir de leurs solutions concentrées (exemple 16). Les mélanges sont réalisés de telle manière que la concentration finale de chaque plasmide corresponde à la dose efficace de chaque plasmide. Les solutions utilisables pour ajuster la concentration finale du vaccin peuvent être soit une solution
- 10 NACI à 0,9 % , soit du tampon PBS.

Des formulations particulières telles que les liposomes, les lipides cationiques, peuvent aussi être mises en oeuvre pour la fabrication des vaccins.

Exemple 26 : Vaccination des porcs

- 15 Les porcs sont vaccinés avec des doses de 100 μ g, 250 μ g ou 500 μ g par plasmide.
- Les injections peuvent être réalisées à l'aiguille par voie intramusculaire. Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous un volume de 2 ml.
- Les injections peuvent être réalisées par voie intradermique en utilisant un
- 20 appareil d'injection à jet liquide (sans aiguille) délivrant une dose de 0,2 ml en 5 points (0,04 ml par point d'injection) (par exemple, appareil "PIGJET"). Dans ce cas, les doses vaccinales sont administrées sous des volumes de 0,2 ou 0,4 ml, ce qui correspond respectivement à une ou à deux administrations. Lorsque
- 25 PIGJET, ces administrations sont réalisées de manière décalée, de façon à ce que les deux zones d'injection soient séparées l'une de l'autre par une distance d'environ 1 à 2 centimètres.

REVENDEICATIONS

1. Formule de vaccin porcin contre la pathologie respiratoire et/ou de reproduction des porcs, comprenant au moins 3 valences de vaccin polynucléotidique comprenant chacune un plasmide intégrant, de manière à exprimer in vivo dans les cellules hôtes, un gène d'une valence de pathogène porcin, ces valences étant choisies parmi deux groupes consistant en virus de la maladie d'Aujeszky, virus de la grippe porcine, virus de la maladie mystérieuse du porc, virus de la parvovirose, virus de la peste porcine classique et bactérie responsable de l'actinobacillose, les plasmides comprenant, pour chaque valence, un ou plusieurs des gènes choisis parmi le groupe consistant en gB et gD pour le virus de la maladie d'Aujeszky, HA, NP, N pour le virus de la grippe porcine, E, ORF3, M pour le virus de la maladie mystérieuse, VP2 pour le virus de la parvovirose, E1, E2 pour le virus de la pestivirose et apxI, apxII et apxIII pour l'actinobacillose.

2. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les valences Aujeszky et grippe porcine.

3. Formule de vaccin selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus l'une au moins des valences choisies parmi maladie mystérieuse et actinobacillose.

4. Formule de vaccin selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la valence peste porcine classique.

5. Formule de vaccin selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en plus au moins une valence choisie parmi le groupe des valences maladie mystérieuse, parvovirose et peste porcine classique.

6. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène HA et/ou NP du virus de la grippe porcine.

7. Formule de vaccin selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend le gène E et/ou ORF3 du virus de la maladie mystérieuse.

8. Formule de vaccin selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend gB et gD d'Aujeszky.

9. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous un volume de dose compris entre 0,1 et 10 ml, de préférence entre 1 et 5 ml.

5 10. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est adaptée à une administration intradermique par jet liquide, de préférence par jets multiples, sous un volume de dose compris entre 0,1 et 0,9 ml, en particulier entre 0,2 et 0,6 ml, de préférence entre 10 0,4 et 0,5 ml.

11. Formule de vaccin selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10 ng et 1 mg, de préférence entre 100 ng et 500 µg, plus préférentiellement encore entre 1 µg et 250 µg par type de plasmide.

15 12. Utilisation d'une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour la fabrication d'un vaccin destiné à vacciner les porcins primo-vaccinés au moyen d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, 20 vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.

13. Kit de vaccination regroupant une formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, et un vaccin 25 choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée, pour une administration de ce dernier en 30 primo-vaccination et pour un rappel avec la formule de vaccin.

14. Formule de vaccin selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, accompagnée d'une notice indiquant que 35 cette formule est utilisable en rappel d'un premier vaccin choisi dans le groupe consistant en vaccin entier vivant, vaccin entier inactivé, vaccin de sous-unité, vaccin recombinant, ce premier vaccin présentant l'antigène codé par le vaccin polynucléotidique ou un antigène assurant une protection croisée.

1/31

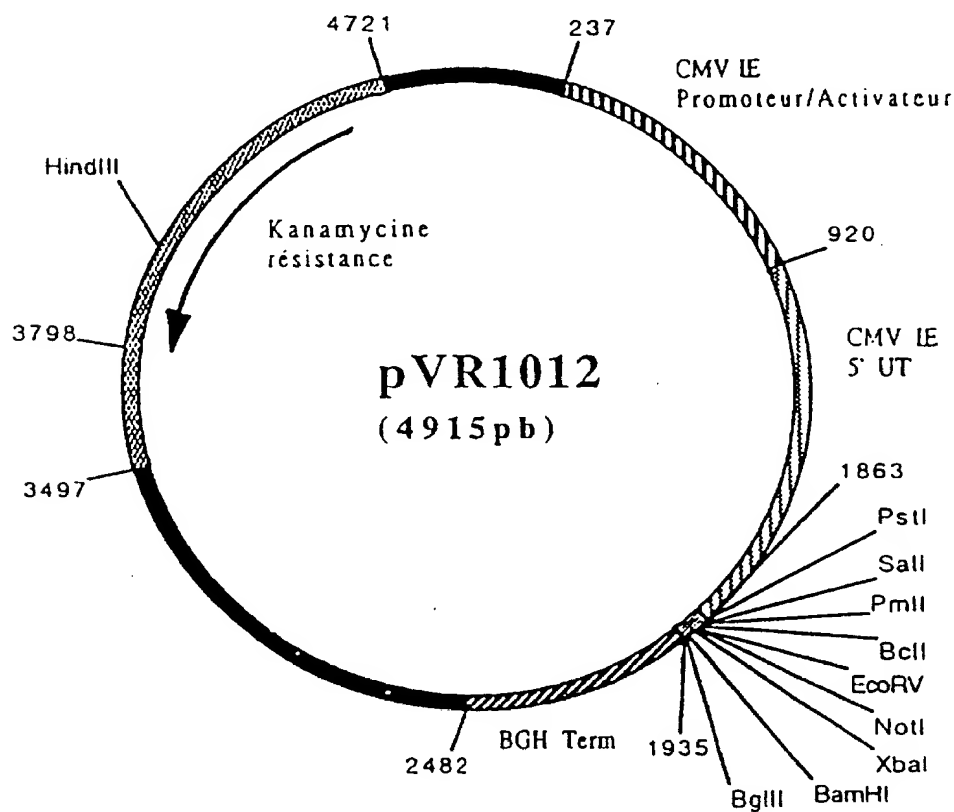


Figure N° 1

2/31

1 ATGCCCCGCTGGTGGCGGTCTTTGGCGCGGGCCCCGGGGGCATCGCCCCGGGCACACGGCGGT
 1 MetProAlaGlyGlyGlyLeuTrpArgGlyProArgGlyHisArgProGlyHisHisGlyGly
 PstI
 64 GCTGGCCTCGGACGTCCTTGGCCTGCTCCACACCACGCTGCAGCTGCGCGGGGCGCCGTCGCG
 22 AlaGlyLeuGlyArgLeuTrpProAlaProHisHisAlaAlaAlaAlaArgGlyAlaValAla
 127 CTAGCGCTGCTGCTGCTGGCGCTCGCCGCGGCCCCGGCGTCCGGCGCGGGCGCCGTGACGCGG
 43 LeuAlaLeuLeuLeuLeuAlaLeuAlaAlaAlaProProCysGlyAlaAlaAlaValThrArg
 190 GCCGCTCGGCCTCGCCGACGCCCCGGGACGGCGCCACCCCCAACGACGTCTCCGCCGAGGCG
 64 AlaAlaSerAlaSerProThrProGlyThrGlyAlaThrProAsnAspValSerAlaGluAla
 XhoI
 253 TCCCTCGAGGAGATCGAGGCGTTCTCCCCGGCCCCCTCGGAGGCCCCCGACGGCGAGTACGGC
 85 SerLeuGluGluIleGluAlaPheSerProGlyProSerGluAlaProAspGlyGluTyrGly
 316 GACCTGGACGCGCGGACGGCCGTGCGCGCGGCCGCGACCGAGCGGGACCGCTTCTACGTCTGC
 106 AspLeuAspAlaArgThrAlaValArgAlaAlaAlaThrGluArgAspArgPheTyrValCys
 379 CCGCCCGCGTCCGGCTCCACGGTGGTGGCGCTGGAGCCCCGAGCAGGCTGCCCGGAGTACTCG
 127 ProProProSerGlySerThrValValArgLeuGluProGluGlnAlaCysProGluTyrSer
 442 CAGGGCGCAACTTCACGGAGGGGATCGCCCTGCTCTTCAAGGAGAACATCGCCCCGCACAAG
 148 GlnGlyArgAsnPheThrGluGlyIleAlaLeuPheLysGluAsnIleAlaProHisLys
 505 TTCAAGGCCCCACATCTACTACAAGAACGTCATCGTCACGACCGTGTGGTCCGGGAGCACGTAC
 169 PheLysAlaHisIleTyrTyrLysAsnValIleValThrThrValThrSerGlySerThrTyr
 568 GCGCCCATCACGAACCGCTTCACAGACCGCGTCCCGTCCCGTGCAGGAGATCACGGACGTG
 190 AlaAlaIleThrAsnArgPheThrAspArgValProValProValGlnGluIleThrAspVal
 631 ATCGACCGCGCGGCAAGTGGCTCTCCAAGGCGGAGTACGTGCGCAACAACCAAGGTGACC
 211 IleAspArgArgGlyLysCysValSerLysAlaGluTyrValArgAsnAsnHisLysValThr
 694 GCCTTCGACCGCGACGAGAACCCCGTCGAGGTGGACCTGCGCCCCCTCGCGCCTGAACGCGCTC
 232 AlaPheAspArgAspGluAsnProValGluValAspLeuArgProSerArgLeuAsnAlaLeu
 757 GGCACCCGCGCCTGGCACACCACCAACGACACCTACACCAAGATCGGCGCGCGGGCTTCTAC
 253 GlyThrArgAlaTrpHisThrThrAsnAspThrTyrThrLysIleGlyAlaAlaGlyPheTyr
 820 CAGACGGGCACCTCCGTCAACTGCATCGTCGAGGAGGTGGAGGCGCGCTCCGTGTACCCCTAC
 274 GlnThrGlyThrSerValAsnCysIleValGluGluValGluAlaArgSerValTyrProTyr
 883 GACTCCTTCGCCCTGTCACGGGGACATGTGTACATGTCCCCCTTCTACGGCTGCGCGAG
 295 AspSerPheAlaLeuSerThrGlyAspIleValTyrMetSerProPheTyrGlyLeuArgGlu
 946 GGGCCCCACGGGAGCAGATCGGCTACGCGCCCCGGCGCTTCCAGCAGGTGGAGCACTACTAC
 316 GlyAlaHisGlyGluGlnIleGlyTyrAlaProGlyArgPheGlnGlnValGluHisTyrTyr
 1009 CCCATCGACCTGGACTCGCGCCTCCGCGCCTCCGAGAGCGTGACGCGCAACTTCTACGCACG
 337 ProIleAspLeuAspSerArgLeuArgAlaSerGluSerValThrArgAsnPheLeuArgThr
 1072 CCGCACTTCACGGTGGCCTGGGACTGGGCCCCCAAGACGCGGCGCGTGTGCAGCCTGGCCAAG
 358 ProHisPheThrValAlaTrpAspTrpAlaProLysThrArgArgValCysSerLeuAlaLys
 1135 TGGCGCGAGGCGGAGGAGATGACCCGCGACGAGACGCGCGACGGCTCCTTCCGCTTACGTCG
 379 TrpArgGluAlaGluGluMetThrArgAspGluThrArgAspGlySerPheArgPheThrSer
 PstI
 1198 CGGGCCCCGCGCCTCCTTCGTCAGCGACGTCACGCAGCTGGACCTGCAGCGCGTGCACCTG
 400 ArgAlaLeuGlyAlaSerPheValSerAspValThrGlnLeuAspLeuGlnArgValHisLeu
 1261 GGCGACTGCGTCTCCGCGAGGCCCTCGGAGGCCATCGACGCCATCTACCGCGCGCGCTACAAC
 421 GlyAspCysValLeuArgGluAlaSerGluAlaIleAspAlaIleTyrArgArgArgTyrAsn
 1324 AGCACGCAGTGTGGCCGCGGACAGGCCGAGGTGTACCTCGCCCGCGGGGCTTCGTGGTG
 442 SerThrHisValLeuAlaGlyAspArgProGluValTyrLeuAlaArgGlyGlyPheValVal

Figure N° 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

3/31

1387 GCCTTCCGCCCCGTGATCTCGAACGAGCTGGCCGAGCTGTACGCGCGGAGCTCGAGCGCCTC
 463 ▶ AlaPheArgProLeuIleSerAsnGluLeuAlaGlnLeuTyrAlaArgGluLeuGluArgLeu
 1450 GGCCTCGCCGGCCCTCGTGGCCCCCGGGCCCCCGGGCCGCGCTCGGGCCCCGGCTCCCCC
 484 ▶ GlyLeuAlaGlyValValGlyProAlaAlaProAlaAlaAlaArgArgAlaArgArgSerPro
 1513 GGGCCGGCGGGGACGCCCCGAGCCGCGCGCGCTCAACGGCACGGGGACCTGGCGATCACCACG
 505 ▶ GlyProAlaGlyThrProGluProProAlaValAsnGlyThrGlyHisLeuArgIleThrThr
 PsII
 1576 GGCTCGGCGGAGTTTGCGCGCCTGCAGTTACCTACGACCACATCCAGGCGCACGTGAACGAC
 526 ▶ GlySerAlaGluPheAlaArgLeuGlnPheThrTyrAspHisIleGlnAlaHisValAsnAsp
 PsII
 1639 ATGCTGGGCGCATCGCGCCGCTGGTGGGAGCTGCAGAACAAAGGACCGCACCCCTGTGGAGC
 547 ▶ MetLeuGlyArgIleAlaAlaAlaTrpCysGluLeuGlnAsnLysAspArgThrLeuTrpSer
 1702 GAGATGTGCGCCCTGAACCCAGCGCCGTGGCCACGGCCCGCTCGGGCAGCGCGTCTGGCGC
 568 ▶ GluMetSerArgLeuAsnProSerAlaValAlaThrAlaAlaLeuGlyGlnArgValCysAla
 1765 CGCATGCTCGGCGACGTGATGGCCATCTCGCGGTGCGTGGAGGTGCGCGCGCGCTGTACGTG
 589 ▶ ArgMetLeuGlyAspValMetAlaIleSerArgCysValGluValArgGlyGlyValTyrVal
 1828 CAGAACTCCATGCGCGTGCCCGCGGAGCGCGCACGTGCTACAGCCGCGCGCTGGTCACCTTC
 610 ▶ GlnAsnSerMetArgValProGlyGluArgGlyThrCysTyrSerArgProLeuValThrPhe
 1891 GAGCACAACGGCACGGCGGTGATCGAGGGCCAGCTCGGCGACGACAACGAGCTCCTCATCTCG
 631 ▶ GluHisAsnGlyThrGlyValIleGluGlyGlnLeuGlyAspAspAsnGluLeuLeuIleSer
 1954 CGCGACCTCATCGAGCCCTGCACCGGCAACCACCGCGCTACTTTAAGCTGGGGAGCGGGTAC
 652 ▶ ArgAspLeuIleGluProCysThrGlyAsnHisArgArgTyrPheLysLeuGlySerGlyTyr
 2017 GTGTACTACGAGGACTACAACCTACGTGCGCATGGTGGAGGTGCCCCGAGACGATCAGCAGCGG
 673 ▶ ValTyrTyrGluAspTyrAsnTyrValArgMetValGluValProGluThrIleSerThrArg
 XhoI
 2080 GTTACCCTGAACCTGACGCTGCTGGAGGACCGCGAGTTCTCTGCCCTCGAGGTGTACACGGC
 694 ▶ ValThrLeuAsnLeuThrLeuLeuGluAspArgGluPheLeuProLeuGluValTyrThrArg
 2143 GAGGAGCTCGCCGACACGGGCTCTCTGGACTACAGCGAGATCCAGCGCCGCAACCAGCTGCAC
 715 ▶ GluGluLeuAlaAspThrGlyLeuLeuAspTyrSerGluIleGlnArgArgAsnGlnLeuHis
 2206 GCGCTCAAGTTCTACGACATCGACCGGTGGTCAAGGTGGACCACAACGTGCTGCTGCGC
 736 ▶ AlaLeuLysPheTyrAspIleAspArgValValLysValAspHisAsnValValLeuLeuArg
 2269 GGCATCGCCAACCTCTTCCAGGGCTCGGCGACGTGGGCGCCCGCTCGGCAAGGTGGTCTCTG
 757 ▶ GlyIleAlaAsnPhePheGlnGlyLeuGlyAspValGlyAlaAlaValGlyLysValValLeu
 2332 GGTGCCACGGGGGCGGTGATCTCGGCCCTCGGCGGCATGGTGTCTCTCTGTTCAACCCCTTC
 778 ▶ GlyAlaThrGlyAlaValIleSerAlaValGlyGlyMetValSerPheLeuSerAsnProPhe
 2395 GGGCGCTCGCCATCGGGCTGCTGGTGTCTGGCCGCGCTGGTTCGCGGCTTCTGGCTACCGG
 799 ▶ GlyAlaLeuAlaIleGlyLeuLeuValLeuAlaGlyLeuValAlaAlaPheLeuAlaTyrArg
 2458 CACATCTCGCGCTGCGCCGCAACCCCATGAAGGCCCTGTACCCCGTCACGACGAAGACGCTC
 820 ▶ HisIleSerArgLeuArgArgAsnProMetLysAlaLeuTyrProValThrThrLysThrLeu
 SalI
 2521 AAGGAGGACGGCGTCGACGAAGGCGACGTGGACGAGGCCAAGCTGGACCAGGCCCCGGACATG
 841 ▶ LysGluAspGlyValAspGluGlyAspValAspGluAlaLysLeuAspGlnAlaArgAspMet
 XhoI
 2584 ATCCGGTACATGTCCATCGTGTGCGCCCTCGAGCAGCAGGAGCACAAGGCGCGCAAGAAGAAC
 862 ▶ IleArgTyrMetSerIleValSerAlaLeuGluGlnGlnGluHisLysAlaArgLysLysAsn
 2647 AGCGGGCCCCGCTGCTGGCCAGCCGCGTGGGGCGATGGCCACGCGCGCGCGCACTACCAG
 683 ▶ SerGlyProAlaLeuLeuAlaSerArgValGlyAlaMetAlaThrArgArgArgHisTyrGln
 XhoI
 2710 CGCCTCGAGAGCGAGGACCCCGACGCCCTGTAG
 904 ▶ ArgLeuGluSerGluAspProAspAlaLeu...

Figure N°2 (suite et fin)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

4/31

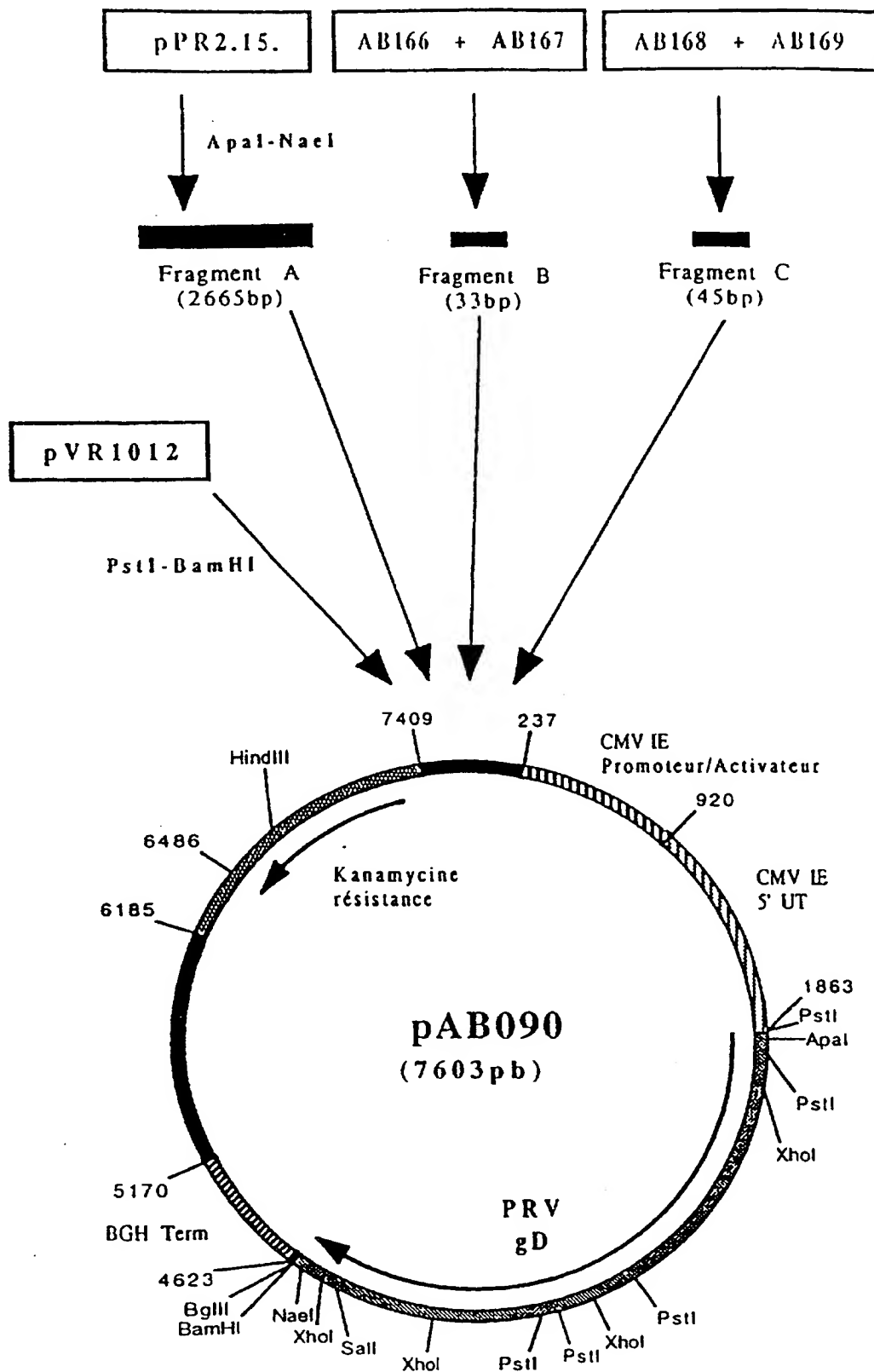


Figure N° 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

5/31

1 ATGCTGCTCGCAGCGCTATTGGCGGGCGCTGGTCGCCCCGACGACGCTCGGTGCGGACGTGGAC
1▶ MetLeuLeuAlaAlaLeuLeuAlaAlaLeuValAlaArgThrThrLeuGlyAlaAspValAsp
64 GCCGTGCCCCGCGCGACCTTCCCCCGCCCGCTACCCGTACACCGAGTCGTGGCAGCTGACG
22▶ AlaValProAlaProThrPheProProProAlaTyrProTyrThrGluSerTrpGlnLeuThr
127 CTGACGACGGTCCCTTCGCCCTTCGTGGGCCCCGCGACGTCTACCACACGCGCCCGCTGGAG
43▶ LeuThrThrValProSerProPheValGlyProAlaAspValTyrHisThrArgProLeuGlu
190 GACCCGTGCGGGGTGGTGGCGCTGATCTCCGACCCGACGCTGGACCGGCTGCTGAACGAGGCG
64▶ AspProCysGlyValValAlaLeuIleSerAspProGlnValAspArgLeuLeuAsnGluAla
253 GTGGCCACCGCGCGCCACGTACCGCGCCACGTGGCCTGGTACCGCATCGCGGACGGGTGC
85▶ ValAlaHisArgArgProThrTyrArgAlaHisValAlaTrpTyrArgIleAlaAspGlyCys
316 GCACACCTGCTGTACTTTATCGAGTACGCCGACTCGGACCCCAGGCAGGCAGATCTTTGGGCG
106▶ AlaHisLeuLeuTyrPheIleGluTyrAlaAspCysAspProArgGlnAlaAspLeuTrpAla
379 CTGCCGCGCGCGCACACGCGGATGTGGTGGACCCCGTCCGCGGACTACATGTTCCCCACGGA
127▶ LeuProAlaProHisHisAlaAspValValAspProValArgGlyLeuHisValProHisGly
442 GGACGAGCTGGGGCTGCTCATGGTGGCCCCGGCGGTTCAACGAGGGCCAGTACCGGCGCCT
148▶ GlyArgAlaGlyAlaAlaHisGlyGlyProArgAlaValGlnArgGlyProValProAlaPro
505 GGTGTCCGTCCGACGGCGTGAACATCCTCACCAGCTTCATGGTGGCGCTCCCCGAGGGGCAAGA
169▶ GlyValArgArgArgArgGluHisProHisArgLeuHisGlyGlyAlaProArgGlyAlaArg
568 GTGCCCCGTCGCCCCGCTGGACCAGCACCGCACGTACAAGTTCGGCGCGTGTGCGAGCGACGA
190▶ ValProValArgProArgGlyProAlaProHisValGlnValArgArgValLeuGluArgArg
631 CAGCTTCAAGCGGGCGTGGACGTGATGCGATTCTCGACGCCGTTCTACCAGCAGCCCCCGCA
211▶ GlnLeuGlnAlaGlyArgGlyArgAspAlaIleProAspAlaValLeuProAlaAlaProAla
694 CCGGGAGGTGGTGAAC TACTGGTACCGCAAGAACGGCCGGACGCTCCCCGGGCCCCACGCCGC
232▶ ProGlyGlyGlyGluLeuLeuValProGlnGluArgProAspAlaProAlaGlyProArgArg
757 CGCCACGCCGTACGCCATCGACCCCGCGCGGCCCTCGGCGGGCTCGCCGAGCCCCGCCCCCG
253▶ ArgHisAlaValArgHisArgProArgAlaAlaLeuGlyGlyLeuAlaGluAlaProAlaPro
820 GCCCCGCCCCCGCCCCCGGCCGAAGCCCGAGCCCGCCCCGGCGACGCCCGCCCCCGACCG
274▶ AlaProAlaProAlaProAlaGluAlaArgAlaArgProGlyAspAlaArgAlaProArgPro
883 CCTGCCCCGACCCGGCGACGCGGGACACGCCCGCGGGGGCGCCCCACGCCCGACCCCCGAG
295▶ ProAlaArgAlaGlyAspAlaGlyProArgArgArgGlyProProHisAlaAlaThrProGlu
946 GCCCGAGACGCCGACCGCCCCCTTCGCCCCGCGCGCGCTCGTGCCAGCGGGTGGCCCCAGCC
316▶ AlaArgAspAlaAlaProProLeuArgProAlaGlyArgArgAlaGlnArgValAlaAlaAla
1009 CGCGGAGCCGTTCAGCCGCGGACCCCCCGCGCGCGGGCGTCTCGCGCCACCGCTCGGTGAT
337▶ ArgGlyAlaValProAlaAlaAspProArgArgAlaGlyArgLeuAlaProProLeuGlyAsp

Figure N° 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

6/31

1072 CGTCGGCACGGGCACCGCGATGGGCGCGCTCCTGGTGGGCGTGTGCGTCTACATCTTCTTCCG
358▶ ArgArgHisGlyHisArgAspGlyArgAlaProGlyGlyArgValArgLeuHisLeuLeuPro
1135 CCTGAGGGGGGCGAAGGGGTATCGCCTCCTGGGCGGTCCCGCGGACGCCGACGAGCTAAAAGC
379▶ ProGluGlyGlyGluGlyValSerProProGlyArgSerArgGlyArgArgArgAlaLysSer
1198 GCAGCCCGGTCCGTAG
400▶ AlaAlaArgSerVal

Figure N° 4 (suite et fin)

7/31

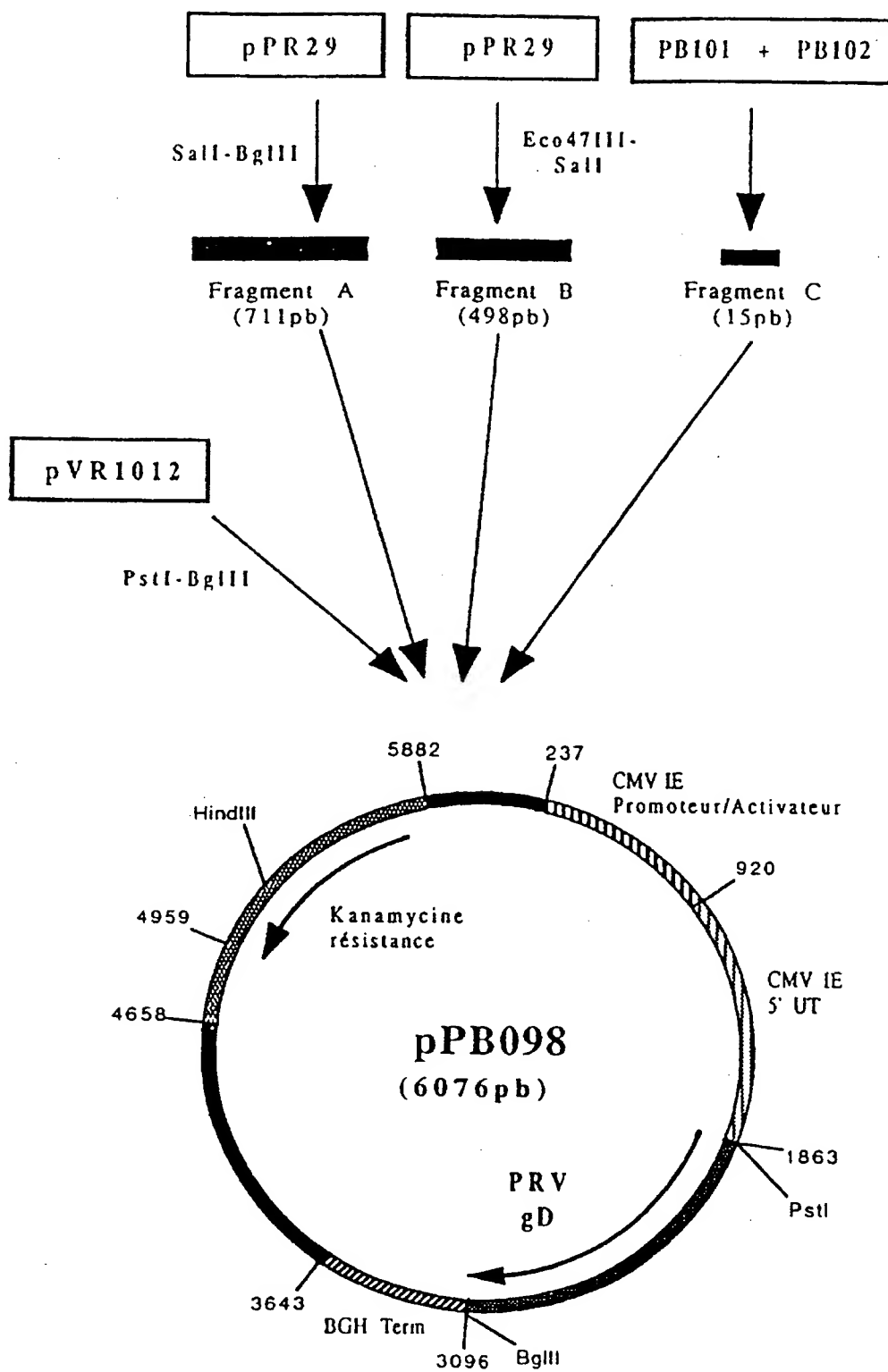


Figure N° 5

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

8/31

1 ATGGAAGCAAACTATTTCGTATTATTCTGTACATTCACTGCGCTGAAAGCTGACACCATCTGT
1▶ MetGluAlaLysLeuPheValLeuPheCysThrPheThrAlaLeuLysAlaAspThrIleCys

64 GTAGGATACCATGCTAACAATTCCACAGATACTGTGACACAATACTGGAGAAGAAATGTGACT
22▶ ValGlyTyrHisAlaAsnAsnSerThrAspThrValAspThrIleLeuGluLysAsnValThr

127 GTGACTCATTCACTTAATTTACTAGAAAACAGTCATAATGGAAGCTCTGCAGCCTGAATGGA
43▶ ValThrHisSerValAsnLeuLeuGluAsnSerHisAsnGlyLysLeuCysSerLeuAsnGly

190 GTAGCCCCCTTGCAACTAGGGAAGTGCAACGTAGCAGGGTGGATCCTTGGCAACCCAGAATGT
64▶ ValAlaProLeuGlnLeuGlyLysCysAsnValAlaGlyTrpIleLeuGlyAsnProGluCys

253 GACCTGTTGCTCACAGCGAATTCATGGTCTTACATAATAGAGACTTCAAATTCAGAAAATGGA
85▶ AspLeuLeuLeuThrAlaAsnSerTrpSerTyrIleIleGluThrSerAsnSerGluAsnGly

316 ACATGCTACCCCGAGAATTCATTGATTATGAGGAATTAAGGGAGCAGCTGAGTTTCAGTGTCT
106▶ ThrCysTyrProGlyGluPheIleAspTyrGluGluLeuArgGluGlnLeuSerSerValSer

379 TCATTTGAAAGGTTTGAAATTTTCCCAAAAGCAAACCTCATGGCCAAATCATGAGACAACCAAA
127▶ SerPheGluArgPheGluIlePheProLysAlaAsnSerTrpProAsnHisGluThrThrLys

442 GGTATTACAGCTGCATGCTCTTACTCTGGAACCCCGAGTTTATCGGAATTTGCTATGGATA
148▶ GlyIleThrAlaAlaCysSerTyrSerGlyThrProSerPheTyrArgAsnLeuLeuTrpIle

505 GTAGAGAGGGAAAATTCCTATCCTAACTCAGCAAATCATACACAAACAACAAAGGGAAAGAA
169▶ ValGluArgGluAsnSerTyrProLysLeuSerLysSerTyrThrAsnAsnLysGlyLysGlu

568 GTGCTTATAATCTGGGAGTGCACCACCCTCCAACTACCAATGACCAACAAAGCCTCTATCAG
190▶ ValLeuIleIleTrpGlyValHisHisProProThrThrAsnAspGlnGlnSerLeuTyrGln

631 AATGCTGATGCATATGTTTCAGTTGGGTCTCAAAAATACAACCGAAGGTTTCACACCAGAAATA
211▶ AsnAlaAspAlaTyrValSerValGlySerSerLysTyrAsnArgArgPheThrProGluIle

694 GCAGCTAGACCTAAAGTCAAAGGACAAGCAGGCAGAATGAATTATTATTGGACATTGTTAGAT
232▶ AlaAlaArgProLysValLysGlyGlnAlaGlyArgMetAsnTyrTyrTrpThrLeuLeuAsp

757 CAAGGAGACACCATAACGTTTGAAGCCACTGGGAACCTTAATAGCACCATGGTACGCCTTCGCA
253▶ GlnGlyAspThrIleThrPheGluAlaThrGlyAsnLeuIleAlaProTrpTyrAlaPheAla

820 TTGAATAAGGGCTCTGGTTCTGGAATTATAACGTCGGATACTCCGGTTCACAATTGTGATACA
274▶ LeuAsnLysGlySerGlySerGlyIleIleThrSerAspThrProValHisAsnCysAspThr

883 AAGTGCCAAACCCCTCATGGGGCCTTGAACAGTAGTCTTCCTTTTCAGAACGTACATCCCATC
295▶ LysCysGlnThrProHisGlyAlaLeuAsnSerSerLeuProPheGlnAsnValHisProIle

946 ACTATTGGAGAATGCCCAAATATGTTAAAAGCACCAAACCTGAGAATGCCAACAGGACTAAGG
316▶ ThrIleGlyGluCysProLysTyrValLysSerThrLysLeuArgMetAlaThrGlyLeuArg

1009 AACGTCCCTCTATTCAATCCAGAGGACTTTTCGGAGCAATTGCTGGATTTCATTGAAGGAGGA
337▶ AsnValProSerIleGlnSerArgGlyLeuPheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluGlyGly

Figure N° 6

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

9/31

1072 TGGACAGGAATGATAGATGGGTGGTATGGGTATCACCATCAGAATGAGCAGGGATCTGGTTAC
358 ▶ TrpThrGlyMetIleAspGlyTrpTyrGlyTyrHisHisGlnAsnGluGlnGlySerGlyTyr

1135 GCAGCTGATCAGAAAAGCACACAAATTGCAATTGACGGGATCAGCAACAAAGTGAACCTCAGTA
379 ▶ AlaAlaAspGlnLysSerThrGlnIleAlaIleAspGlyIleSerAsnLysValAsnSerVal

1198 ATTGAGAAAATGAACACTCAATTCAGTGCAGTGGGCAAGGAATTCATGATCTAGAAAAAAGG
400 ▶ IleGluLysMetAsnThrGlnPheThrAlaValGlyLysGluPheAsnAspLeuGluLysArg

1261 ATTGAGAATTGGAATAAGAAAGTCGATGATGGGTTTTTGGATGTTTGGACATATAATGCTGAC
421 ▶ IleGluAsnLeuAsnLysLysValAspAspGlyPheLeuAspValTrpThrTyrAsnAlaGlu

1324 TTGCTCGTTTTGCTCGAGAACGAAAGGACTCTAGATTTCCATGACTTTAACGTAAGAAATTTA
442 ▶ LeuLeuValLeuLeuGluAsnGluArgThrLeuAspPheHisAspPheAsnValArgAsnLeu

1387 TATGAAAAGGTCAAGTCACAATTGAGAAACAATGCCAAAGAAATCGGGAATGGTTGTTTTGAG
463 ▶ TyrGluLysValLysSerGlnLeuArgAsnAsnAlaLysGluIleGlyAsnGlyCysPheGlu

1450 TTCTATCACAAATGTGATGACGAATGCATGAAGAGCGTAAAGAATGGCACATATAACTACCCC
484 ▶ PheTyrHisLysCysAspAspGluCysMetLysSerValLysAsnGlyThrTyrAsnTyrPro

1513 AAATATTCAGAAGAATCCAAATTGAATAGAGAGGAAATAGACGGTGTGAAACTAGAATCAATG
505 ▶ LysTyrSerGluGluSerLysLeuAsnArgGluGluIleAspGlyValLysLeuGluSerMet

1576 GGAGTTTACCAGATTTTGGCGATCTACTCCACAGTCGCCAGTTCCCTGGTCTTGTTAGTCTCC
526 ▶ GlyValTyrGlnIleLeuAlaIleTyrSerThrValAlaSerSerLeuValLeuValSer

1639 CTGGGGGCAATCAGCTTCTGGATGTGTTCTAATGGGTCATTGCAATGCAGAATATGCATTTAA
547 ▶ LeuGlyAlaIleSerPheTrpMetCysSerAsnGlySerLeuGlnCysArgIleCysIle...

Figure N° 6 (suite et fin)

10/31

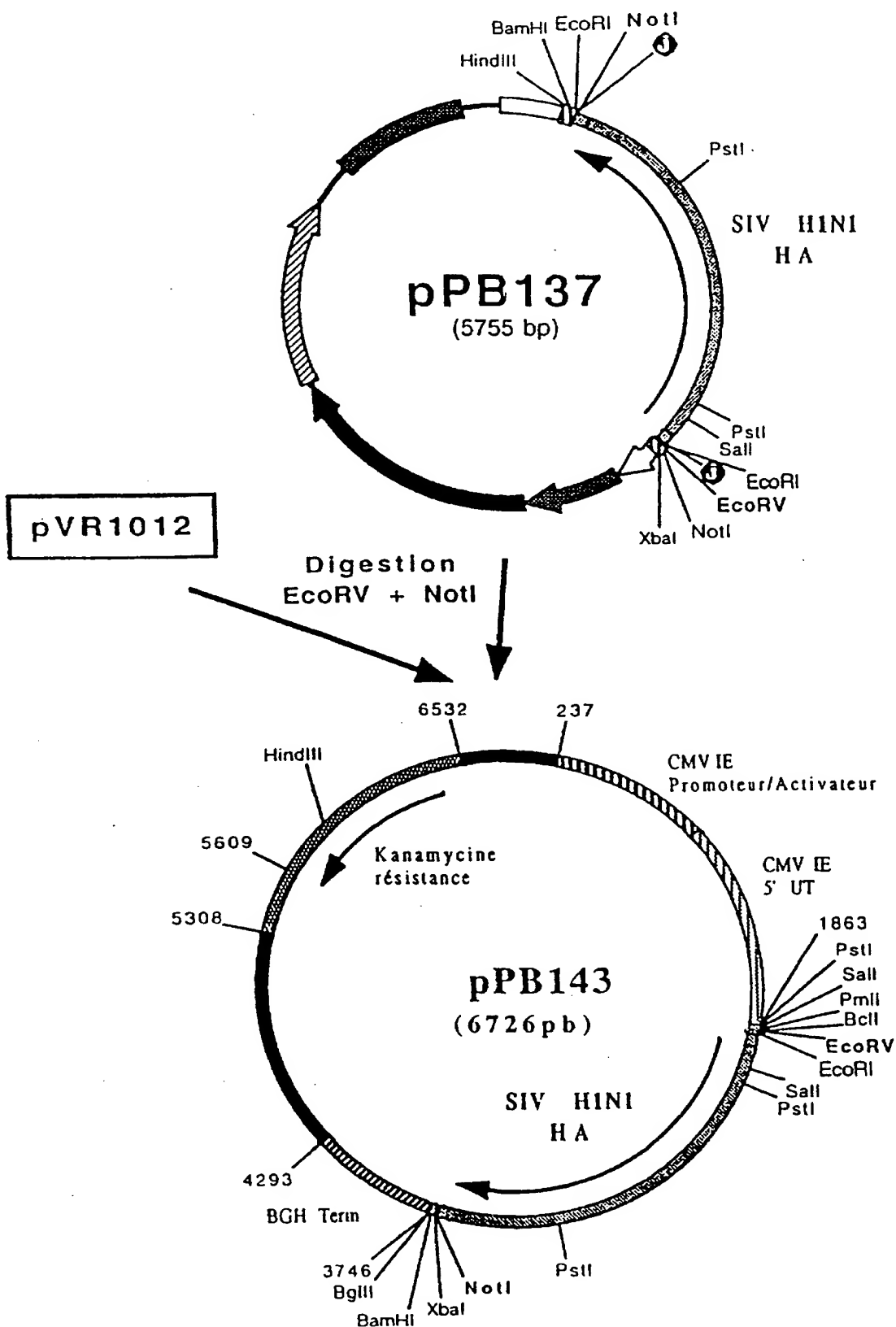


Figure N° 7

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

11/31

1 ATGGCGTCTCAAGGCACCAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAACGCCAGAAT
1▶ MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgGlnAsn
64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGGTTGGTGAATTGGAAGATTCTACATACAG
22▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln
127 ATGTGCACTGAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA
43▶ MetCysThrGluLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle
190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGT
64▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer
253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACCTGGAGGTCCAATCTACAGAAAGAGAGACGGAAAATGGATG
85▶ AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet
316 AGAGAGCTGATTCTATATGACAAAGAGGAGATCAGGAGGATTTGGCGTCAAGCAAACAATGGT
106▶ ArgGluLeuIleLeuTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly
379 GAAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA
127▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr
442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCGTACTGGGATGGACCCCAGAATGTGCTCTCTGATGCAA
148▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln
505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGCGGCAGTAAAGGGAGTTGGGACGATG
169▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet
568 GTAATGGAAGTGAATTCGGATGATAAAAGCGGGATCAATGATCGGAACCTTCTGGAGAGGCGAA
190▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysAlaGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu
631 AATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTTTCAG
211▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln
694 ACAGCAGCGCAACAAGCAATGATGGACCAGGTGCGAGAAATGACAAATCCTGGGAATGCTGAG
232▶ ThrAlaAlaGlnGlnAlaMetMetAspGlnValArgGluMetThrAsnProGlyAsnAlaGlu
757 ACTGAAGACCTTATCTTTCTGGCACGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA
253▶ ThrGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys
820 TCCTGCCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA
274▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu
863 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGTCTGCTCCAAAACAGCCAGGTGTTTCAGCCTC
295▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu
946 ATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGCTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA
316▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla
1009 GCATTTGAAGATCTGAGAGTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAGAGTGGTCCCAAGAGGACAA
337▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrArgValValProArgGlyGln

Figure N° 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

12/31

1072 CTGTCCACCAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGAGTCCAGTACT
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetGluSerSerThr

1135 CTTGAACTGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAACACCAACCAACAG
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln

1198 AGAGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACAACCTTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTTC
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnLeuThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe

1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg

1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCCTTCCAGGGGCGGGGA
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly

1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACATGAGTAAT
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspMetSerAsn

1450 GAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAA
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAspAsn...

Figure N° 8 (suite et fin)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

13/31

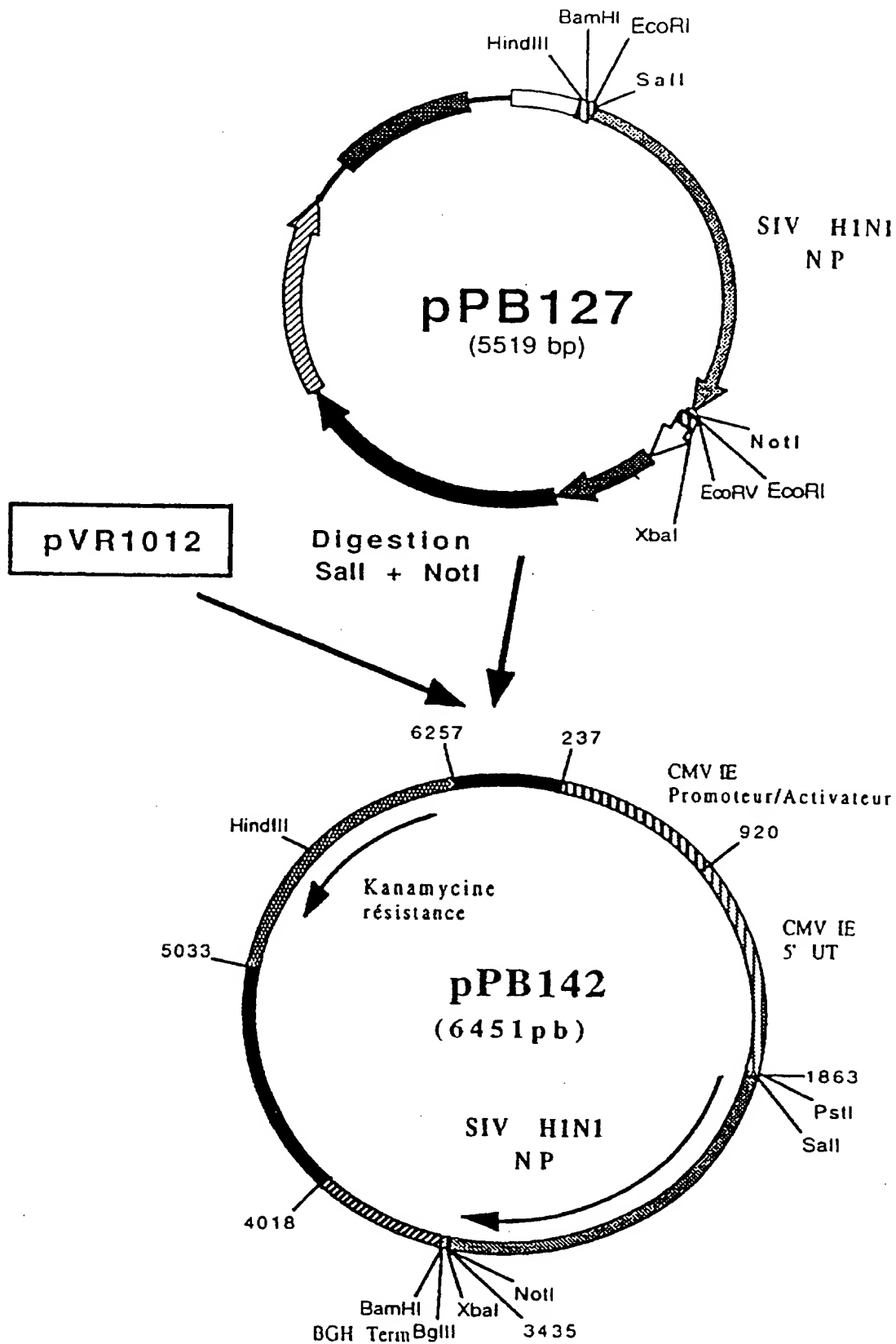


Figure N° 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

14/31

1 ATGAAGACTGTCATTGCCTTGAGCTACATTTTCTGTCTGGTTCTTGCCCAAGACCTTCCAGAA
1▶ MetLysThrValIleAlaLeuSerTyrIlePheCysLeuValLeuGlyGlnAspLeuProGlu

64 AATGGCAGCAGCACAGCAAAGCCTGGTCTGGGACATCATGCGGTGCCAAACGGAACGTTAGTG
22▶ AsnGlySerSerThrAlaLysProGlyLeuGlyHisHisAlaValProAsnGlyThrLeuVal

127 AAAACAATCACGAATGATCAGATCGAAGTGACTAATGCTACTGAGCTGGTCCAGAGTTTCTCA
43▶ LysThrIleThrAsnAspGlnIleGluValThrAsnAlaThrGluLeuValGlnSerPheSer

190 ATGGGTAAATATGCAACAATCCTCATCGAGTTCTTGATGGAGCAAACGTACACTGATAGAT
64▶ MetGlyLysIleCysAsnAsnProHisArgValLeuAspGlyAlaAsnCysThrLeuIleAsp

253 GCTCTATTGGGGGACCCTCATTGTGATGGCTTTCAAAATGAGAAATGGGACCTTTTCGTTGAA
85▶ AlaLeuLeuGlyAspProHisCysAspGlyPheGlnAsnGluLysTrpAspLeuPheValGlu

316 CGCAGCAAATGCTTCAGCAACTGTTACCCCTTATGATGTGCCAGATTATGCCTCCCTTAGGTCA
106▶ ArgSerLysCysPheSerAsnCysTyrProTyrAspValProAspTyrAlaSerLeuArgSer

379 CTAATTGCCTCTTCGGGCACTTTGGAGTTTATCAATGAAGGTTTCAATTGGACTGGGGTCACT
127▶ LeuIleAlaSerSerGlyThrLeuGluPheIleAsnGluGlyPheAsnTrpThrGlyValThr

442 CAGAACGGAGGAAGCAATGCTTGCAAGAGGGGGCCTGATAGCGGTTTCTTCAGTAGGCTGAAC
148▶ GlnAsnGlyGlySerAsnAlaCysLysArgGlyProAspSerGlyPhePheSerArgLeuAsn

505 TGGTTGTACAAATCAGGAAACACATACCCGATGCTGAACGTGACTATGCCAAACAGTGATAAT
169▶ TrpLeuTyrLysSerGlyAsnThrTyrProMetLeuAsnValThrMetProAsnSerAspAsn

568 TTTGACAAATTATACATTTGGGGGGTTCACCATCCGAGCACAGACAGGGAACAAACCAACCTA
190▶ PheAspLysLeuTyrIleTrpGlyValHisHisProSerThrAspArgGluGlnThrAsnLeu

631 TATGTTCAAGTATCAGGGAAAGCAACGGTTTTCACCAAGAGAAGCCAGCAGACCATAATCCCG
211▶ TyrValGlnValSerGlyLysAlaThrValPheThrLysArgSerGlnGlnThrIleIlePro

694 AACAGTCGGTCTAGACCCTGGGTAAGGGTCTGTCTAGTAGAATAAGCATCCATTGGACAATA
232▶ AsnSerArgSerArgProTrpValArgGlyLeuSerSerArgIleSerIleHisTrpThrIle

757 GTTAAACCGGGGGACATTCTGATAATTAATAGTAATGGGAACCTAATTGCTCCTCGGGGTAC
253▶ ValLysProGlyAspIleLeuIleIleAsnSerAsnGlyAsnLeuIleAlaProArgGlyTyr

820 TTCAAATGCACAATGGGAGAAGCTCAATAATGAGGTCAGATGCACCTATTGGCACCTGCAGT
274▶ PheLysMetHisAsnGlyArgSerSerIleMetArgSerAspAlaProIleGlyThrCysSer

883 TCTGAATGCATCACTCCAAATGGAAGCATCCCAAATGACAAACCCCTTTCAAACGTAACAAG
295▶ SerGluCysIleThrProAsnGlySerIleProAsnAspLysProPheGlnAsnValAsnLys

946 ATCACATATGGGGCATGTCCTAAGTATGTTAAACAAAACACTCTGAAGTTGGCAACAGGGATG
316▶ IleThrTyrGlyAlaCysProLysTyrValLysGlnAsnThrLeuLysLeuAlaThrGlyMet

1009 CGGAATATACCGGAAAAACAACTAGAGGCATATTTCGGCGCAATAGCAGGTTTCATAGAGAAT
337▶ ArgAsnIleProGluLysGlnThrArgGlyIlePheGlyAlaIleAlaGlyPheIleGluAsn

Figure N° 10

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/31

1072 GGTGGGAAGGAATGGTAGACGGCTGGTACGGTTTCAGACATCAAAATTCTGAGGGCACAGGA
358▶ GlyTrpGluGlyMetValAspGlyTrpTyrGlyPheArgHisGlnAsnSerGluGlyThrGly
1135 CAAGCAGCAGACCTTAAAAGCACCCAAGCAGCCATCGACCAAATCAACGGGAAACTGAATAGA
379▶ GlnAlaAlaAspLeuLysSerThrGlnAlaAlaIleAspGlnIleAsnGlyLysLeuAsnArg
1198 CTAATCGAGAAGACGAACGGGAAATTCCATCAAATCGAAAAGGAATTCTCAATAGTAGAAGGG
400▶ LeuIleGluLysThrAsnGlyLysPheHisGlnIleGluLysGluPheSerIleValGluGly
1261 AGAATTCAGGACCTCGAGAAATACGTTGAAGACACTAAAATAGATCTCTGGTCTTACAATGCC
421▶ ArgIleGlnAspLeuGluLysTyrValGluAspThrLysIleAspLeuTrpSerTyrAsnAla
1324 GAACCTCTTGTCGCTCTGGAGAACCAACATACAATTGATCTGACTGACTCGGAAATGAGCAAA
442▶ GluLeuLeuValAlaLeuGluAsnGlnHisThrIleAspLeuThrAspSerGluMetSerLys
1387 CTGTTTGAAAAACAAGGAGGCAACTGAGGGAAATGCTGAGGACATGGGAAACGGTTGCCCTT
463▶ LeuPheGluLysThrArgArgGlnLeuArgGluAsnAlaGluAspMetGlyAsnGlyCysLeu
1450 CAAATATACCACAAATGTGACAATGCTTGATAGAGTCAATCAGAAATGGGACTTATGACCAT
484▶ GlnIleTyrHisLysCysAspAsnAlaCysIleGluSerIleArgAsnGlyThrTyrAspHis
1513 AATGAATACAGAGACGAAGCATTAAACAACCGATTTTCAGATCAAAGGTGTTGAGCTGAAGTCC
505▶ AsnGluTyrArgAspGluAlaLeuAsnAsnArgPheGlnIleLysGlyValGluLeuLysSer
1576 GGATACAAAGACTGGATCCTGTGGATTTCCTCTGCCATATCATGCTTTTTGCTTTGTGTGTT
526▶ GlyTyrLysAspTrpIleLeuTrpIleSerSerAlaIleSerCysPheLeuLeuCysValVal
1639 TTGCTAGGATTTATCATGTGGGCCTGCCAGAAAGGCAACATTAGGTGCAACATTTGCATCTGA
547▶ LeuLeuGlyPheIleMetTrpAlaCysGlnLysGlyAsnIleArgCysAsnIleCysIle...

Figure N° 10 (suite et fin)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

16/31

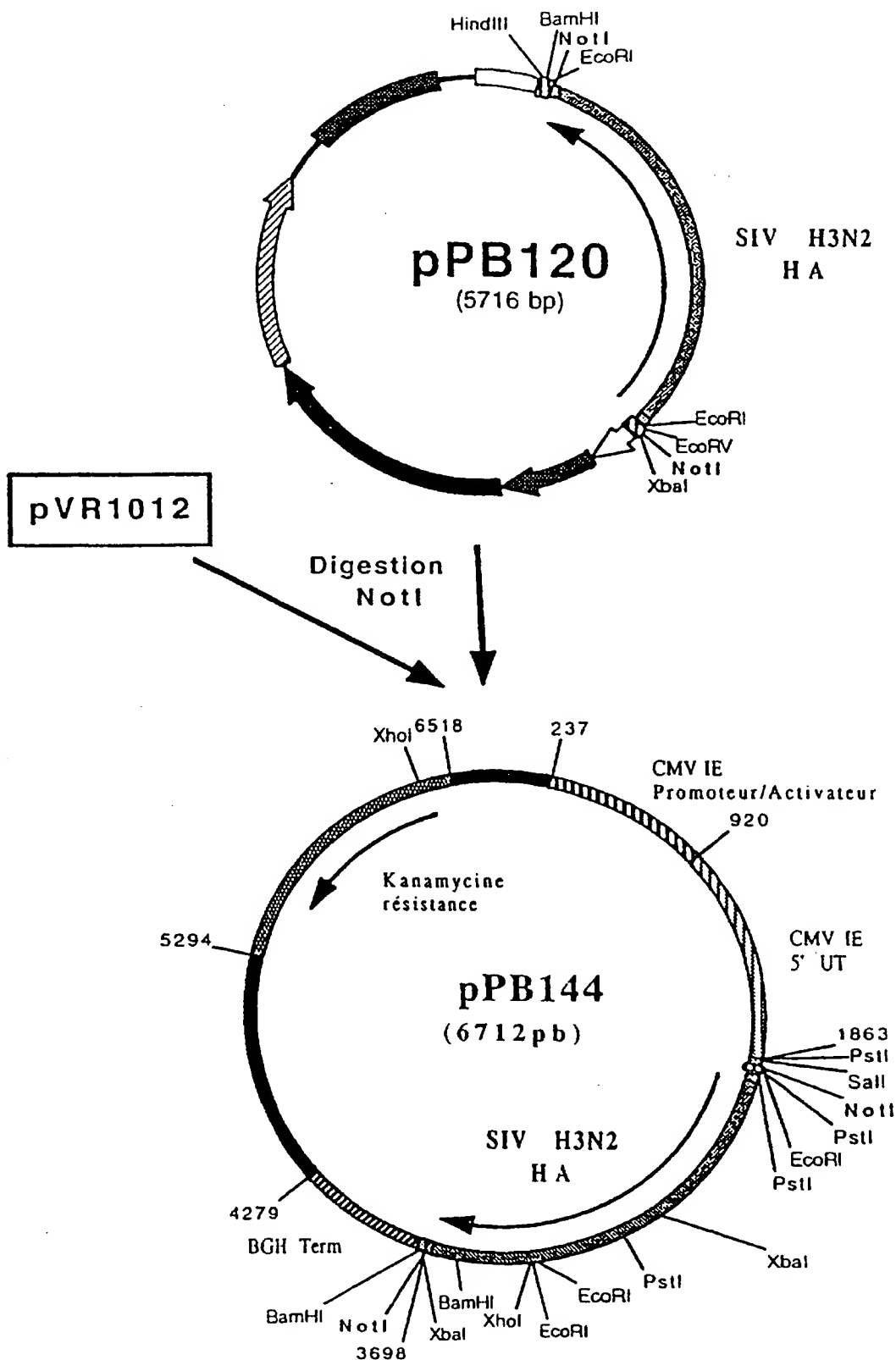


Figure N° 11

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

17/31

1 ATGGCGTCTCAAGGCACTAAACGATCTTATGAGCAGATGGAAACCGGTGGAGAACGCCCGGAAT
1▶ MetAlaSerGlnGlyThrLysArgSerTyrGluGlnMetGluThrGlyGlyGluArgArgAsn
64 GCTACTGAAATCAGAGCATCTGTTGGGGGAATGCTTGGTGGAAATTGGAAGATTCTACATACAG
22▶ AlaThrGluIleArgAlaSerValGlyGlyMetValGlyGlyIleGlyArgPheTyrIleGln
127 ATGTGCACTAAACTCAAACCTCAGTGACTATGAAGGGAGGCTGATCCAGAACAGCATAACAATA
43▶ MetCysThrLysLeuLysLeuSerAspTyrGluGlyArgLeuIleGlnAsnSerIleThrIle
190 GAGAGAATGGTTCTCTCTGCATTTGATGAGAGGAGGAACAAATACCTGGAAGAACATCCCAGT
64▶ GluArgMetValLeuSerAlaPheAspGluArgArgAsnLysTyrLeuGluGluHisProSer
253 GCGGGGAAGGACCCAAAGAAAACCTGGAGGTCCAATATACAGAAAGAGAGACGGAAAATGGATG
85▶ AlaGlyLysAspProLysLysThrGlyGlyProIleTyrArgLysArgAspGlyLysTrpMet
316 AGAGAGCTGATTATGTATGACAAAGAGGAGATCAGGAGCATTTCGCGTCAAGCAAACAATGGT
106▶ ArgGluLeuIleMetTyrAspLysGluGluIleArgArgIleTrpArgGlnAlaAsnAsnGly
379 GAAGATGCTACTGCTGGTCTCACTCATCTGATGATTGGCATTCCAACCTGAATGATGCCACA
127▶ GluAspAlaThrAlaGlyLeuThrHisLeuMetIleTrpHisSerAsnLeuAsnAspAlaThr
442 TATCAGAGAACAAGAGCTCTCGTGCCTACTGGGATGGACCCCAAGATGTGCTCTCTGATGCAA
148▶ TyrGlnArgThrArgAlaLeuValArgThrGlyMetAspProArgMetCysSerLeuMetGln
505 GGATCAACTCTCCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGTGACAGCAGTAAAGGGAGTTGGGACGATG
169▶ GlySerThrLeuProArgArgSerGlyAlaAlaGlyAlaAlaValLysGlyValGlyThrMet
568 GTAATGGAAGTATTCCGATGATAAAGCGGGGGATCAATGATCGGAACCTTCTGGAGAGGCGAA
190▶ ValMetGluLeuIleArgMetIleLysArgGlyIleAsnAspArgAsnPheTrpArgGlyGlu
631 AATGGACGAAGAACAAGAATTGCATATGAGAGAATGTGCAACATCCTCAAAGGGAAATTTTCAG
211▶ AsnGlyArgArgThrArgIleAlaTyrGluArgMetCysAsnIleLeuLysGlyLysPheGln
694 ACAGCAGCGCAACGAGCAACGATGGACCAGGTGCGAGAAAGCAGAAATCCTGGGAATGCTGAG
232▶ ThrAlaAlaGlnArgAlaThrMetAspGlnValArgGluSerArgAsnProGlyAsnAlaGlu
757 ATTGAAGACCTTATCTTTCTAGCACGATCTGCACTCATTCTGAGAGGATCAGTGGCTCATAAA
253▶ IleGluAspLeuIlePheLeuAlaArgSerAlaLeuIleLeuArgGlySerValAlaHisLys
820 TCCTGTCTGCCTGCTTGTGTATATGGACTTGTGTGGCAAGTGGATATGACTTTGAAAGAGAA
274▶ SerCysLeuProAlaCysValTyrGlyLeuValValAlaSerGlyTyrAspPheGluArgGlu
883 GGGTACTCTCTAGTCGGAATAGATCCTTTCCGCTGCTCCAGAACAGCCAGGTGTTTCAGCCTC
295▶ GlyTyrSerLeuValGlyIleAspProPheArgLeuLeuGlnAsnSerGlnValPheSerLeu
946 ATTAGACCAAATGAGAATCCAGCACATAAGAGTCAGTTGGTATGGATGGCATGCCATTCTGCA
316▶ IleArgProAsnGluAsnProAlaHisLysSerGlnLeuValTrpMetAlaCysHisSerAla
1009 GCATTTGAAGATCTGAGACTGTCAAGTTTCATCAGAGGGACAAAAGTGGTCCCAAGAGGACAA
337▶ AlaPheGluAspLeuArgValSerSerPheIleArgGlyThrLysValValProArgGlyGln

Figure N° 12

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

18/31

1072 CTGTCCACTAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAAAACATGGAAACAATGGACTCCATTACT
358 ▶ LeuSerThrArgGlyValGlnIleAlaSerAsnGluAsnMetGluThrMetAspSerIleThr
1135 CTTGAAC TGAGAAGCAAATACTGGGCTATAAGAACCAGGAGCGGAGGAAACACCAACCAACAG
379 ▶ LeuGluLeuArgSerLysTyrTrpAlaIleArgThrArgSerGlyGlyAsnThrAsnGlnGln
1198 AGGGCATCTGCAGGGCAAATCAGTGTACAACCTACTTTCTCGGTACAGAGAAATCTTCCTTTC
400 ▶ ArgAlaSerAlaGlyGlnIleSerValGlnProThrPheSerValGlnArgAsnLeuProPhe
1261 GAGAGAGCGACCATCATGGCAGCATTACAGGGAACACTGAAGGCAGAACATCTGACATGAGG
421 ▶ GluArgAlaThrIleMetAlaAlaPheThrGlyAsnThrGluGlyArgThrSerAspMetArg
1324 ACTGAAATTATAAGAATGATGGAAAGTGCCAGACCAGAAGATGTGTCCTTCCAGGGCGGGGA
442 ▶ ThrGluIleIleArgMetMetGluSerAlaArgProGluAspValSerPheGlnGlyArgGly
1387 GTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAAGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCTTTGACGTGAGTAAT
463 ▶ ValPheGluLeuSerAspGluLysAlaThrAsnProIleValProSerPheAspValSerAsn
1450 GAGGGATCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATAACAATTAA
484 ▶ GluGlySerTyrPhePheGlyAspAsnAlaGluGluTyrAsnAsn...

Figure N° 12 (suite et fin)

19/31

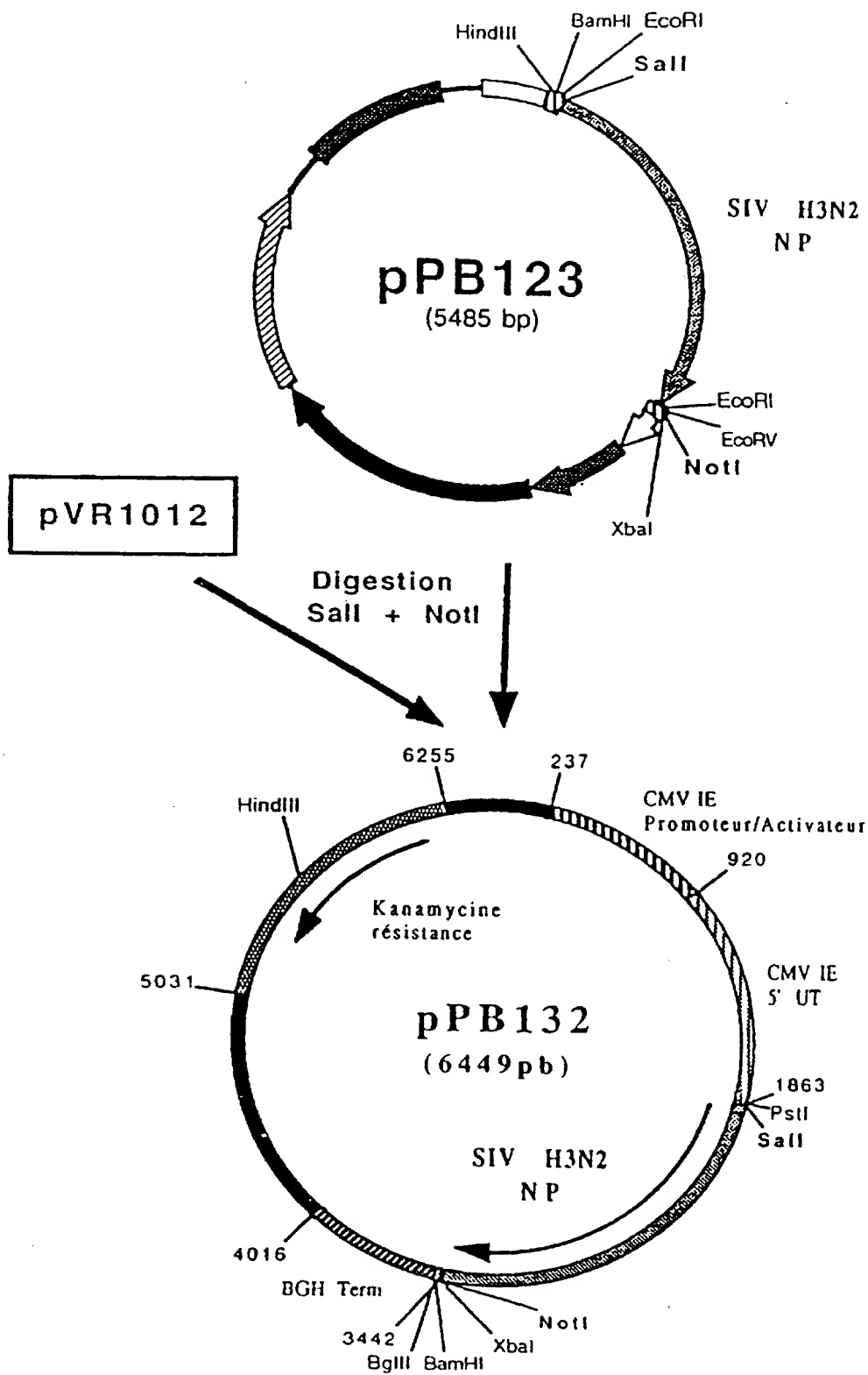


Figure N° 13

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

20/31

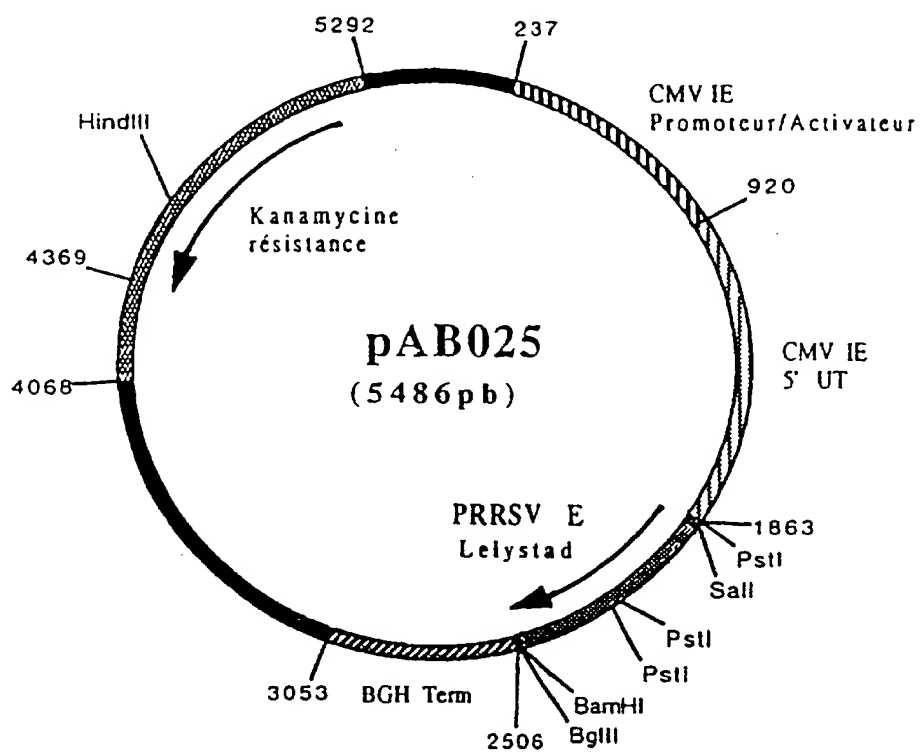


Figure N° 14

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

21/31

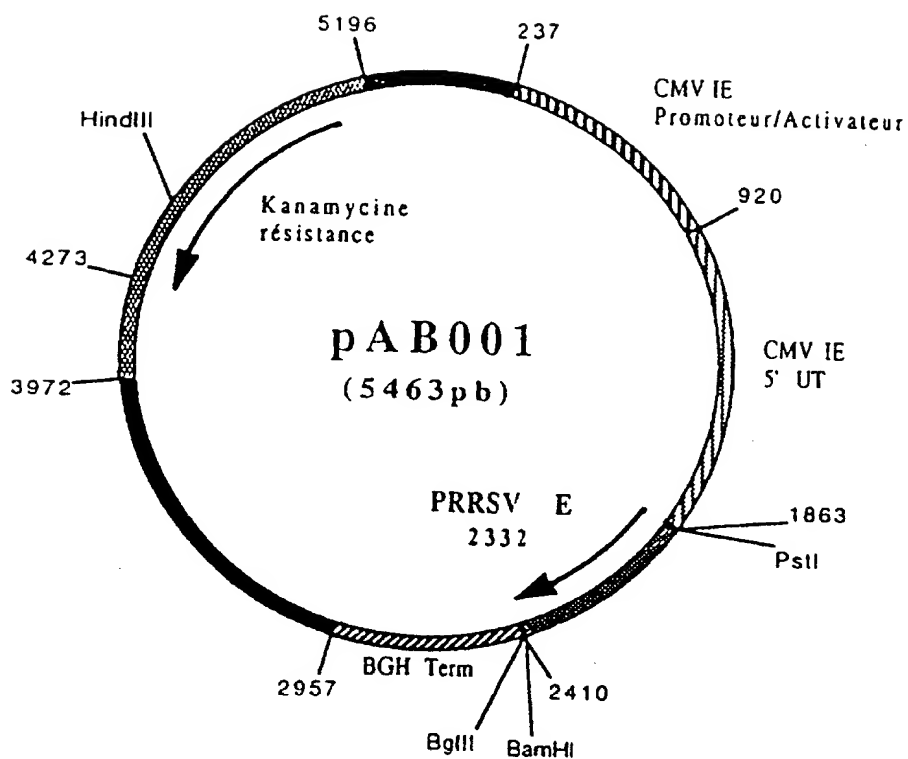


Figure N° 15

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

22/31

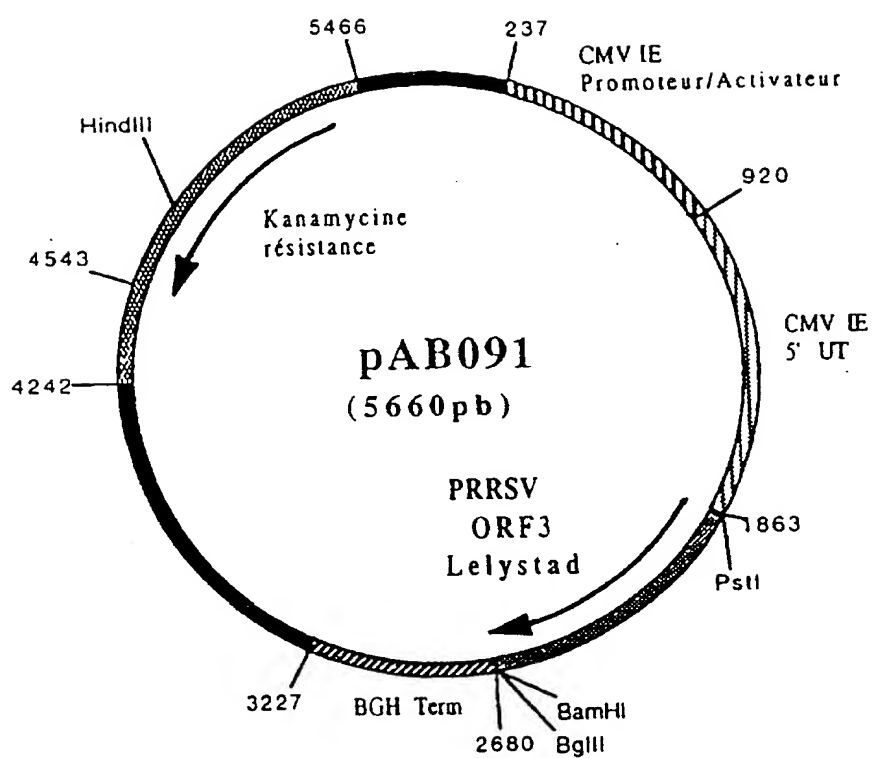


Figure N° 16

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

23/31

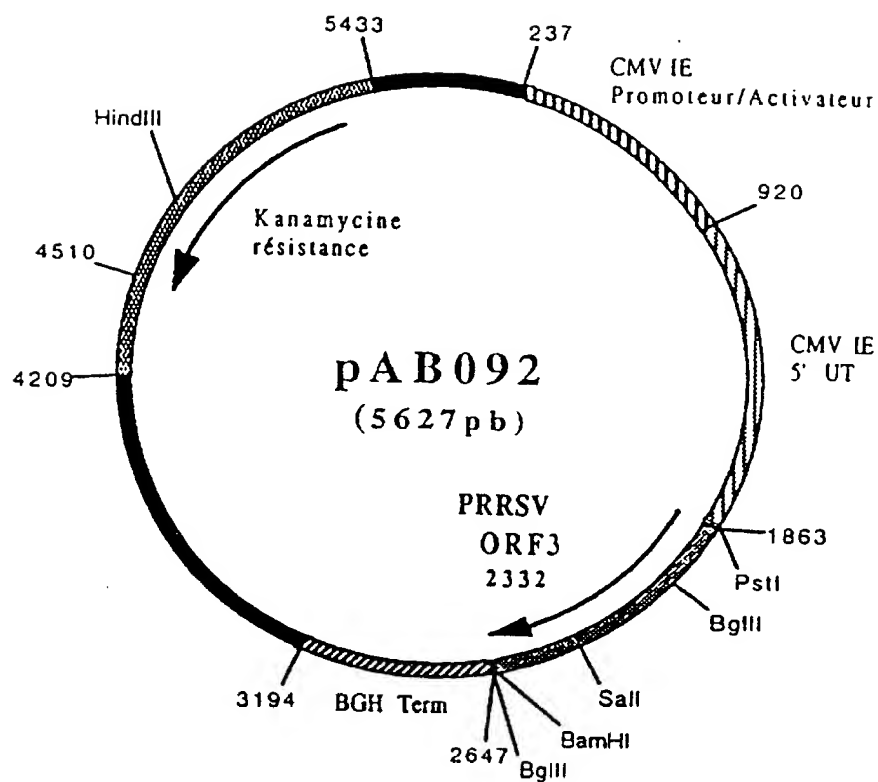


Figure N° 17

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

24/31

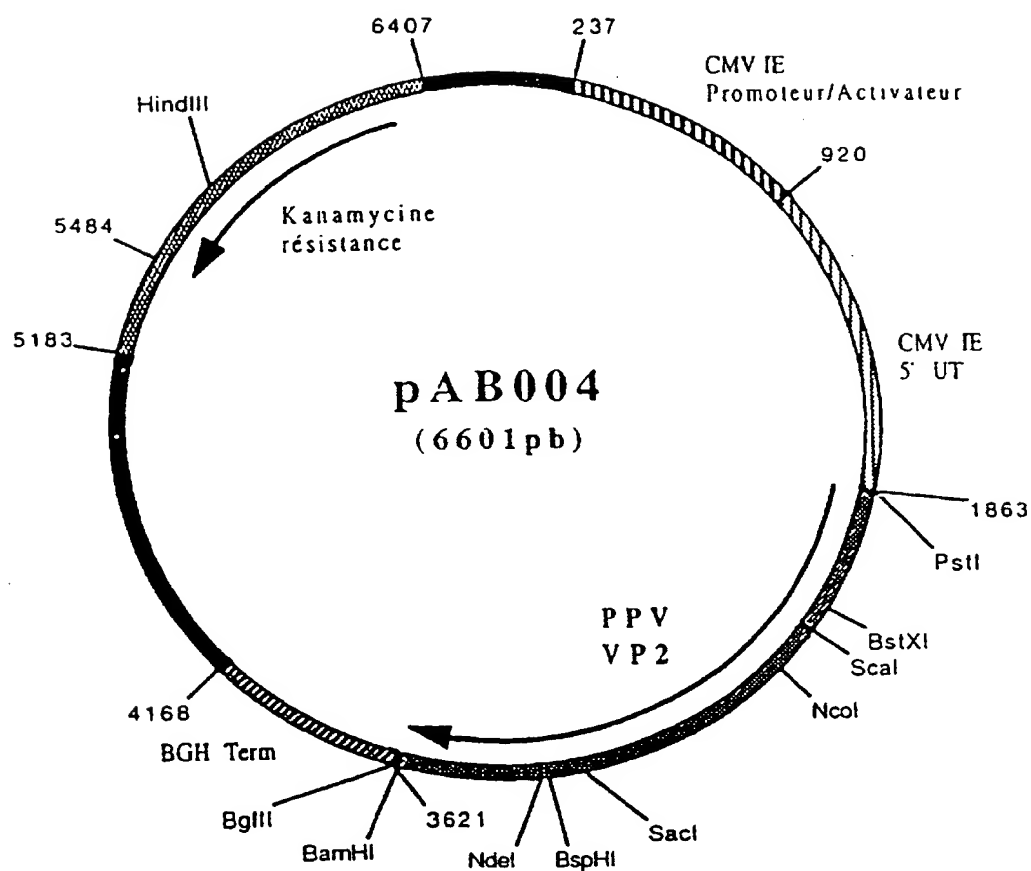


Figure N° 18

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

25/31

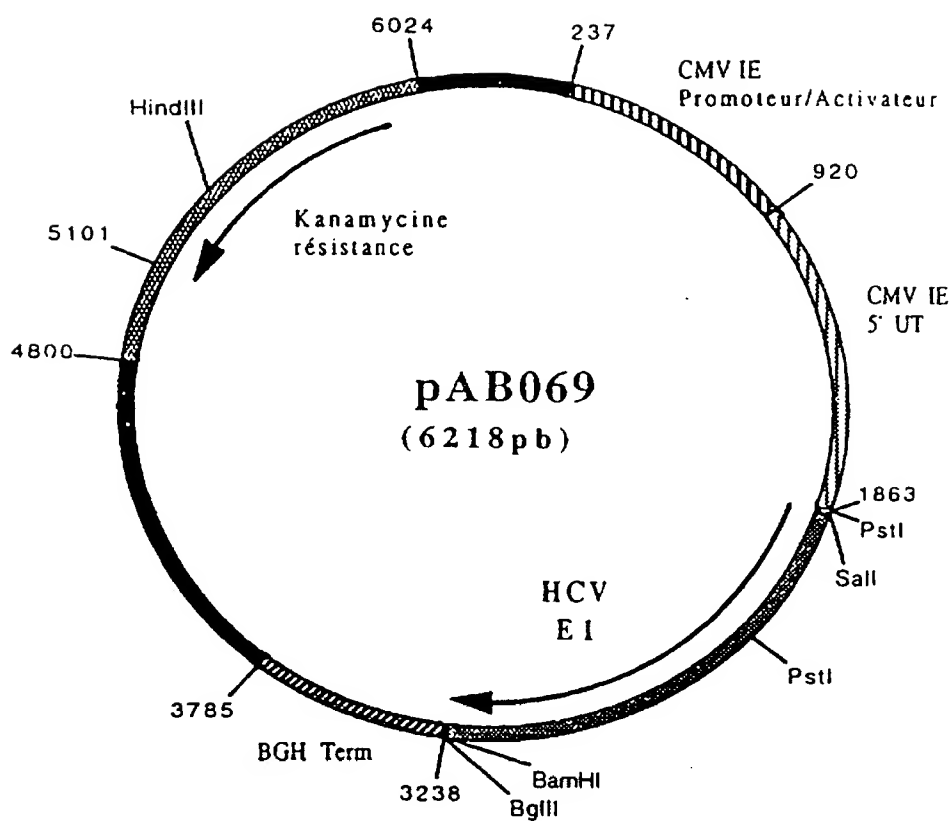


Figure N° 19

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

26/31

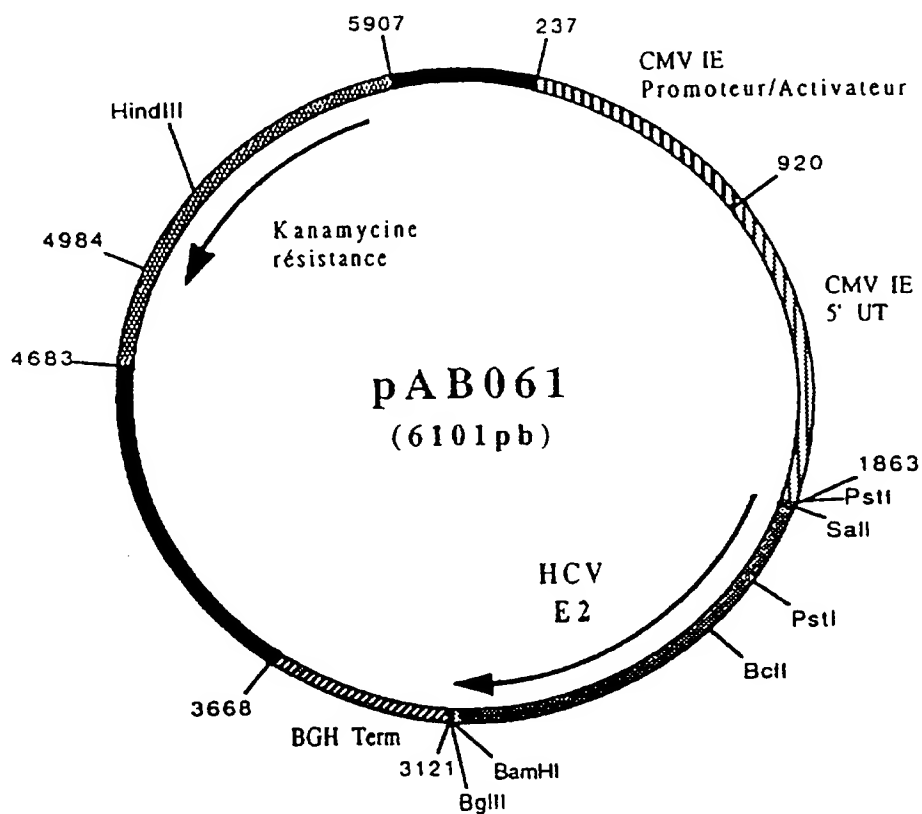


Figure N° 20

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

27/31

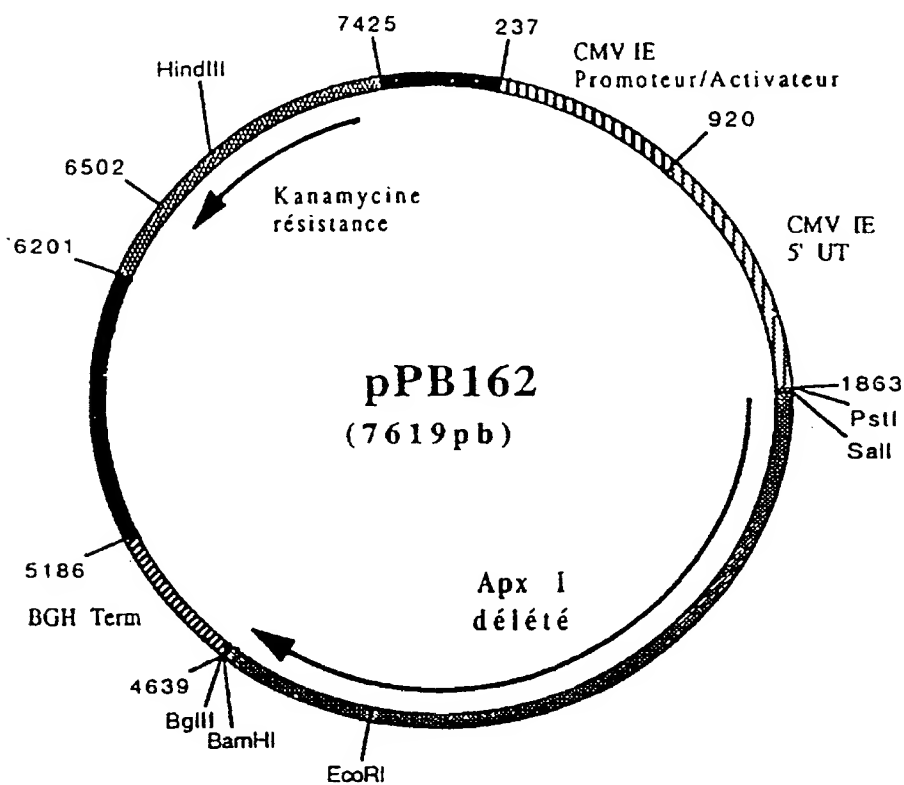


Figure N° 21

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

28/31

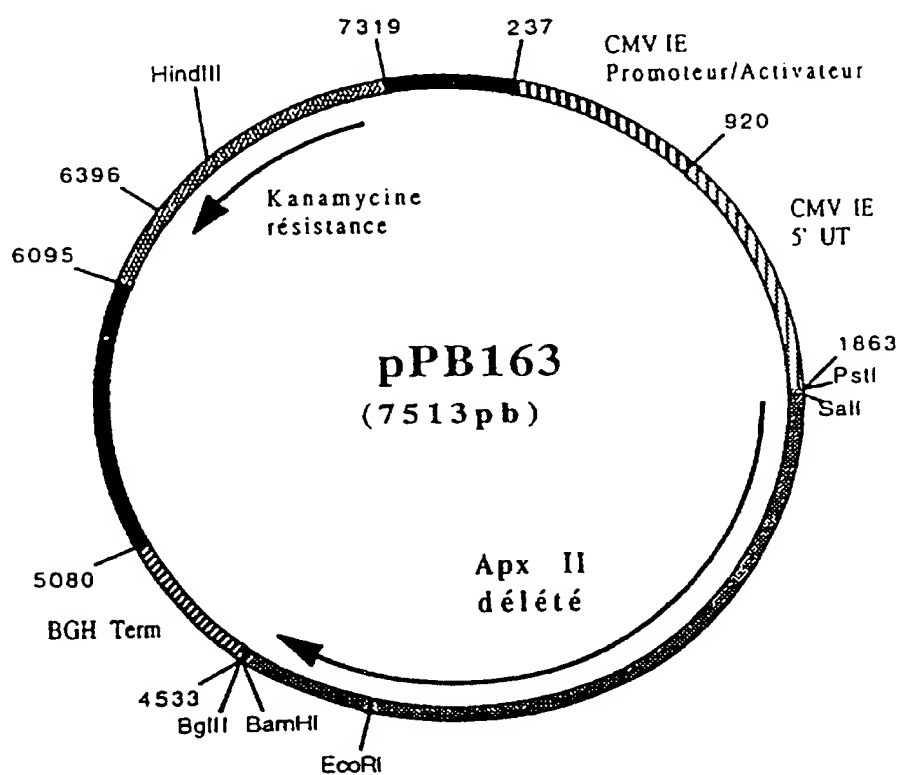


Figure N° 22

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

29/31

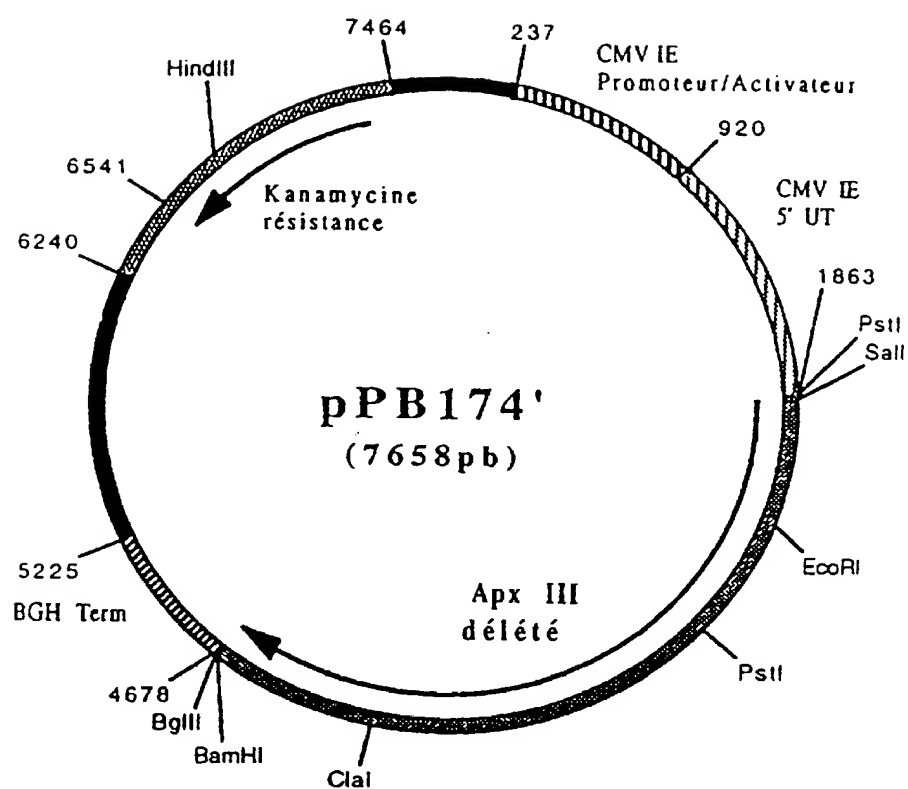


Figure N° 23

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

30/31

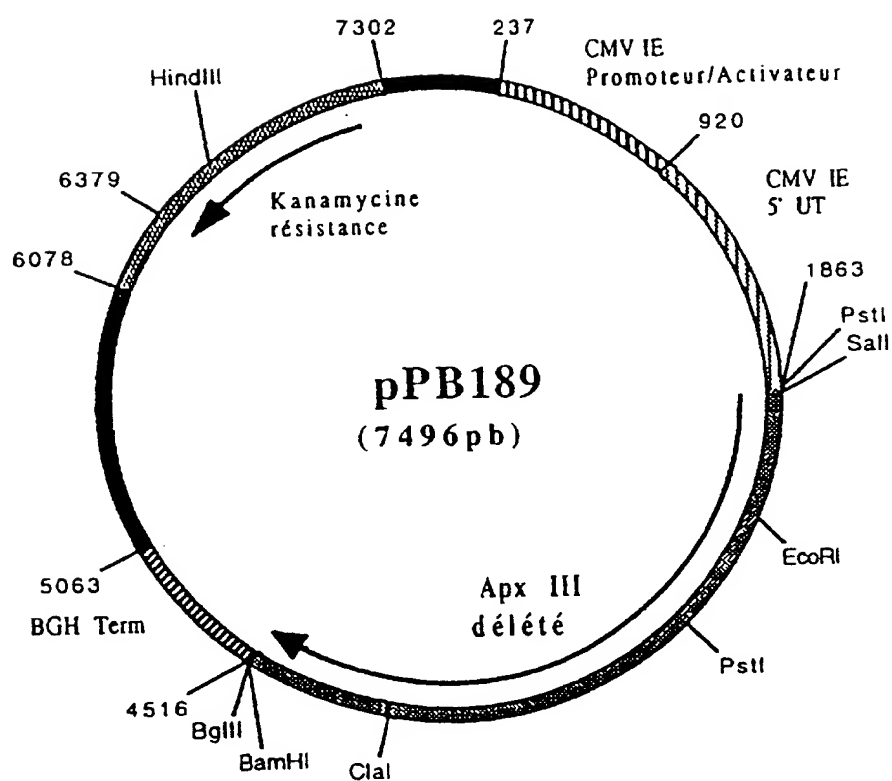


Figure N° 24

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

31/31

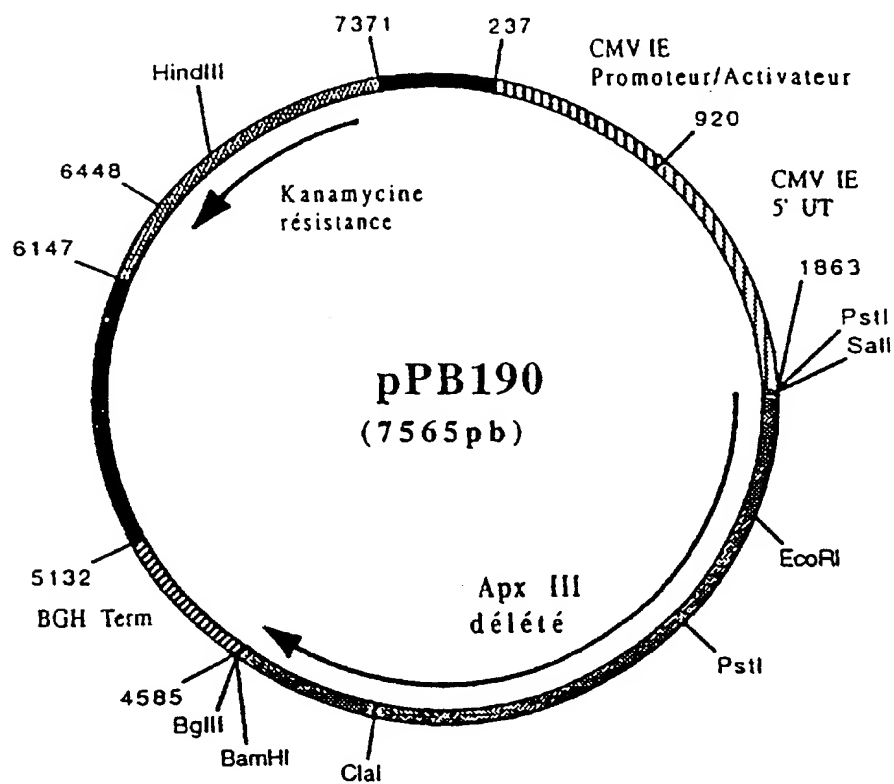


Figure N° 25

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 97/01313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/38 C12N15/44 C12N15/40 C12N15/35 C12N15/31
A61K39/295

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 06619 A (PAUL PREM S ; MENG XIANG JIN (US); HALBUR PATRICK (US); MOROZOV IGO) 7 March 1996 see claims 1,14	1-14
A	WO 95 20660 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL ; ST JUDE CHILDREN S RESEARCH HO (US)) 3 August 1995 cited in the application see page 1, line 27 - page 3, line 13 see page 6, line 16 - page 13, line 33	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 1997

Date of mailing of the international search report

09/12/1997

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9606619 A	07-03-96	CA 2198461 A EP 0776209 A	07-03-96 04-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A EP 0740704 A JP 9508622 T US 5620896 A	03-08-95 06-11-96 02-09-97 15-04-97

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/01313

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/38 C12N15/44 C12N15/40 C12N15/35 C12N15/31
A61K39/295

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 06619 A (PAUL PREM S ; MENG XIANG JIN (US); HALBUR PATRICK (US); MOROZOV IGO) 7 mars 1996 voir revendications 1,14 ---	1-14
A	WO 95 20660 A (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL ; ST JUDE CHILDREN S RESEARCH HO (US)) 3 août 1995 cité dans la demande voir page 1, ligne 27 - page 3, ligne 13 voir page 6, ligne 16 - page 13, ligne 33 -----	1-14

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

2 décembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

09/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Sitch, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema. Internationale No

PCT/FR 97/01313

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9606619 A	07-03-96	CA 2198461 A	07-03-96
		EP 0776209 A	04-06-97
WO 9520660 A	03-08-95	CA 2181832 A	03-08-95
		EP 0740704 A	06-11-96
		JP 9508622 T	02-09-97
		US 5620896 A	15-04-97

